

DIE KARDIALE PHÄNOTYPISIERUNG DER TASK-1-DEFIZIENTEN MAUS

Maria Martina Schullenberg

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet. beim Fachbereich
Veterinärmedizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2013

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2013

© 2013 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen

Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Eingereicht über das Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Ernst Petzinger

Aus der Klinik für Kinderkardiologie und Pneumologie
der Universitätsklinik Düsseldorf

Betreuerin: Prof. Dr. Birgit Donner

Die kardiale Phänotypisierung der TASK-1-defizienten Maus

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Maria Martina Schullenberg

Tierärztin aus Madrid

Gießen 2013

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Herr Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Ernst Petzinger

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Birgit Donner

Prüfer : Prof. Dr. Martin Diener

Tag der Disputation: 08. August 2013

DAS HERZ MARSCHIERT NICHT IM GLEICHSCHRITT – ES TANZT.

(Maximilian Moser)

*meinen Eltern
und Marion*

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	7
1.1 Ionen-/ Kaliumkanäle	7
1.1.1 K ₂ P-Kanäle	8
1.1.2 Veränderungen von Ionenkanälen und ihre klinische Relevanz	9
1.1.3 TASK-1: Expression, Funktion und Regulation	11
1.2 Transgene Tiere als Untersuchungsmodell	13
1.2.1 Herstellung transgener Tiere	14
1.2.2 Für Kaliumkanäle genetisch modifizierte Mausmodelle	15
1.2.3 Mutationen von Ionenkanälen und deren Auswirkungen auf den klinischen Phänotyp	16
1.3 Ziel der vorliegenden Arbeit	17
2. Material und Methoden	18
2.1 Tiere	18
2.1.1 TASK-1 defiziente Mäuse	18
2.1.2 Genotypisierung	19
2.1.2.1 Southern Blot	19
2.1.2.2 Real-Time PCR	20
2.1.3 Tierhaltung	23
2.1.3.1 Zucht	23
2.1.3.2 Versuchstiere	23
2.1.4 Genehmigung	24
2.2 Western Blot	24
2.2.1 Proteinextraktion	24
2.2.2 Elektrophoretische Auftrennung des Proteingemisches	25
2.2.3 Proteintransfer auf eine Membran (Blot)	26
2.2.4 Kopplung eines spezifischen Antikörpers an das gesuchte Protein	27
2.2.5 Sichtbarmachung der Reaktion durch Chemolumineszenz	28
2.2.6 Endogene Kontrolle	29
2.3 Versuche am isolierten Herzen/Langendorff-Präparation	32
2.3.1 Grundlagen	32
2.3.2 Vorgehen	33
2.3.2.1 Vorbereitung	34
2.3.2.2 Herzpräparation	34
2.3.3 Ableitung Monophasischer Aktionspotentiale	36
2.3.3.1 Qualitätskriterien für MAP	38
2.3.3.2 Auswertung der Monophasischen Aktionspotentiale	39
2.4 Echokardiographie	39
2.4.1 Grundlagen	39
2.4.2 Durchführung	41
2.4.3 Auswertung	41
2.5 Anthropometrische Analysen	42
2.6 Erstellung eines telemetrischen Elektrokardiogramms	43
2.6.1 Aufbau der Messeinheit	43
2.6.2 Operatives Vorgehen zur Transmitterimplantation	44
2.6.3 Erstellung des 24-Stunden-EKGs	45
2.6.4 Erstellung der Belastungs-EKGs	46
2.6.4.1 Schwimmen	46
2.6.4.2 Laufen	47
2.6.4.3 Medikamentöse Stimulation	48
2.6.5 Auswertung	48
2.7 Aufzeichnung von Oberflächen-EKGs	48
2.8 Berechnung der „Heart Rate Variability“	49
2.8.1 Grundlagen	49
2.8.2 Vorgehen	50
2.9 Analyse von Ischämie- und Reperfusionseignissen	52
2.9.1 Durchführung	53
2.9.2 Auswertung	55
2.9.2.1 Planimetrie	55
2.9.2.2 Elektrokardiogramm	56
3. Ergebnisse	57
3.1 Tiere	57

3.1.1 Zuchtbuchauswertung	57
3.2 Western Blot.....	59
3.3 Versuche am isolierten Herzen/Langendorff-Präparation.....	61
3.3.1 Entwicklung geeigneter Elektroden und Stimulationsmethode	61
3.3.2 Stabilität	64
3.3.3 Ergebnisse	65
3.4 Echokardiographie	66
3.5 Anthropometrische Analysen	67
3.6 Telemetrie/Elektrophysiologie	68
3.6.1 24-Stunden-EKGs.....	68
3.6.2 Belastungs-EKGs	69
3.6.2.1 Schwimmen	69
3.6.2.2 Laufbandergometrie	70
3.6.2.3 Pharmakologische Belastung mit Dobutamin und Epinephrin	71
3.7 Oberflächen-EKGs	73
3.8 Heart Rate Variability	74
3.9 TASK-1 im Rahmen von Ischämie und Reperfusion	77
4. Diskussion	79
4.1 TASK-1-defiziente Tiere.....	79
4.2 Western Blot.....	79
4.3 Versuche am isolierten Herzen / Langendorff-Präparation.....	80
4.4 Echokardiografie	81
4.5 Gravimetrie.....	82
4.6 Telemetrische Untersuchung	82
4.6.1 24-Stunden-EKGs und Belastungs-EKGs	82
4.6.2 Medikamentöse Stimulation nach körperlicher Belastung.....	83
4.7 Oberflächen-EKGs	84
4.8 „Heart Rate Variability“	85
4.9 Myokardinfarkte.....	86
5. Zusammenfassung	88
6. Summary	89
7. Abkürzungsverzeichnis.....	90
8. Literaturverzeichnis	93
9. Erklärung	108
10. Publikationen	109
11. Danksagung	110

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1 Kaliumkanäle: Darstellung der verschiedenen Anzahl von Transmembranhelices (aus Nerbonne et al., 2001)	8
Abb. 1.2 Titelbild Nature No. 5893, 1982	13
Abb. 1.3 Herstellung transgener Mäuse (aus Schenkel, 2006).....	15
Abb. 2.1 Darstellung der Kassette und ihrer Position im Genom (aus Aller et al., 2005)	19
Abb. 2.2 Beispiel Southern Blot (aus Aller et al., 2008)	20
Abb. 2.3 Aufbau des Blottings	26
Abb. 2.4 a.) Antigen-Antikörper Bindungsstellen b.) Aufbau eines Antikörpermoleküls (aus Campbell, 2001)	27
Abb. 2.5 ECL-Reaktion (aus: crb Newsletter May 10)	28
Abb. 2.6 Vergleichende Darstellung eines humanen MAP, links nach Franz (1999) und eines murinen MAP, rechts, nach Knollmann et al (2001)	33
Abb. 2.7 Langendorff-Apparatur im Faradayschen Käfig.....	33
Abb. 2.8 Schematische Darstellung des Mäuseherzens, Facies auricularis (nach Nickel et al., 1992)	35
Abb. 2.9 Darstellung der korrekt positionierten Kanüle (nach Nickel et al, 1992, bearbeitet).....	36
Abb. 2.10 Ableitung von MAP in der Langendorff-Aparatur (zweite EMG-Elektrode nicht angelegt) ...	37
Abb. 2.11 Beispiel für MAP-Aufzeichnung mit PowerLab 800 und CHART.....	37
Abb. 2.12 Schematische Darstellung der MAP-Auswertung.....	38
Abb. 2.13 M-Mode in der parasternal langen Achse: Darstellung der Messpunkte.....	41
Abb. 2.14 Tibia eines Hundes (aus Nickel et al., 1992)	42
Abb. 2.15 Schematische Darstellung der EKG-Aufzeichnung	44
Abb. 2.15 Schematische Darstellung der EKG- Aufzeichnung	44
Abb. 2.16 Veranschaulichung der Implantat-Maus-Größenverhältnisse	44
Abb. 2.17 Maus beim Schwimmversuch	47
Abb. 2.18 in Chart festgelegte Grenzen zur HRV-Analyse (time domain)	51
Abb. 2.19 Freilegung der LAD	54
Abb. 2.20 Beispiel für eine planimetrische Auswertung	55
Abb. 3.1. Mortalität nach Genotyp; Kaplan-Meier-Kurve.....	58
Abb. 3.2 Anzahl Welpen je Wurf vergleichend	59
Abb. 3.3 Western Blot; Vergleichende Darstellung der zwei TASK-1 Antikörper	59
Abb. 3.4 Western Blot: TWIK-2 und TREK-1 detektierte Banden	60
Abb. 3.5 MAP-Elektroden der Firma Hugo-Sachs® (li.) und Boston Scientific® (re)	61
Abb. 3.6 neu entwickelte MAP-Elektroden der Fa. Hugo Sachs.....	62
Abb. 3.7 MAP-Elektrode der Arbeitsgruppe Kirchhof (auf Basis der Franz-Elektrode)	63
Abb. 3.8 Vergleich der MAP-Elektroden der AG Kirchhof (oben, rot) und Fa. Hugo Sachs (unten, blau)	64
Abb. 3.9 Übereinander gelegtes natives MAP von TASK-1 (-/-) und TASK-1-(+/+) Mäusen	65
Abb. 3.10 APD90 bei verschiedenen Herzfrequenzen, grafische und tabellarische Darstellung	66
Abb. 3.11 Vergleichende Darstellung der minimalen, mittleren und maximalen Herzfrequenz im Tag und Nachtzyklus.....	68
Abb. 3.12 Herzfrequenzen während des Schwimmversuchs.....	69
Abb. 3.13 Herzfrequenzen während des Laufbandversuchs	71
Abb. 3.14 Herzfrequenzen unter Dobutamin.....	72
Abb. 3.15 Herzfrequenzen unter Epinephrin.....	72
Abb. 3.17 Ergebnisse der manuell korrigierten Datensätze der Time domain analysis	76
Tab. 3.8: Ergebnisse der Frequency domain analysis, tabellarisch.....	76
Abb. 3.18 Ergebnisse der Frequency domain analysis, grafisch	77
Abb. 3.19 Infarktgröße vergleichend, grafisch und tabellarisch	78

1. Einleitung

1.1 Ionen-/ Kaliumkanäle

Auf zellulärer Ebene wird eine Vielzahl von Prozessen über den Austausch elektrischer Ladungen gesteuert, indem Ionen entlang einer Potenzialdifferenz diffundieren oder durch Kanäle in der Zellmembran transportiert werden. Es handelt sich dabei um streng regulierte molekulare Prozesse, deren Störung zum Beispiel durch das Fehlen eines bestimmten Ionenkanals weitreichende Folgen für den Gesamtorganismus haben kann. Genauso kann die Mutation eines Ionenkanals zur Funktionssteigerung oder zum Funktionsverlust eines noch immer exprimierten Kanals führen. Dies zeigt sich in Erkrankungen wie dem Long-QT-Syndrom (LQTS)(Abriel et al, 2013), Short-QT-Syndrom (SQTS)(Patel et al., 2008) oder Brugada-Syndrom (Napolitano et al., 2006; Smits et al., 2002; Maron et al., 2006), deren Ursache die Mutation verschiedener Natrium- oder Kaliumkanäle ist.

An diesem Ionenaustausch sind einerseits relativ unspezifische Kanäle beteiligt, wie zum Beispiel die TRP-Kanäle (Transient Receptor Potential Channels), durch die sowohl K^+ -Ionen als auch Na^+ -Ionen und Ca^{2+} -Ionen permeieren. Es gibt aber auch hoch selektive Kanäle, die nur ein bestimmtes Ion und dieses auch nur zu bestimmten Aktivitätsphasen des Kanals die Zellmembran passieren lassen. Bei den ionenspezifischen Kanälen sind die Kaliumkanäle mit gegenwärtig über 100 verschiedenen charakterisierten am häufigsten vertreten. Die Zellmembranen der meisten Zellen enthalten K^+ -selektive Kanäle (Coetzee et al., 1999; Bayliss et al. 2008; Bednarczyk, 2009). Kalium ist das entscheidende Ion für die Erregungsweiterleitung im Muskel und in den Nerven und es spielt eine entscheidende Rolle bei der Sekretion von Hormonen (Coetzee et al., 1999). Kaliumkanäle sind essentiell zur Regulation des Membranpotentials, aber auch bei der Regulation des Zellvolumens und der Kaliumhomöostase (Coetzee et al., 1999; Tamargo et al., 2004).

Im Herzmuskel regulieren Kaliumkanäle das Ruhemembranpotential, die Form des Aktionspotentials, die Automatie und die Refraktärzeit (Nerbonne et al., 2001). Die Modulation der Kaliumkanäle des Herzens kann über intrazelluläre Signalkaskaden, Hormone, Neurotransmitter, aber auch durch Verabreichung von Medikamenten erfolgen. Bei pathologischen Veränderungen, beispielsweise einer Herzmuskelhypertrophie, werden ihre elektrischen Eigenschaften und ihre Expression verändert, was wiederum zu Herzrhythmusstörungen führen kann (Näbauer et al., 1998; Tomaselli et al., 1999).

Die Klassifizierung der Kaliumkanäle erfolgt nach ihrer Struktur und Funktion. Strukturell betrachtet unterscheidet man gegenwärtig drei Großgruppen von Kaliumkanälen.

- 1.) Die spannungsaktivierten, „voltage-gated“ Kaliumkanäle (Kv), die sechs Transmembrandomänen und eine Pore aufweisen. Zu dieser Gruppe werden auch die Ca^{2+} -aktivierten gezählt (Coetzee et al., 1999).
- 2.) Die einwärtsgerichteten, „inwardly rectifying“ Kaliumkanäle (KIR), welche zwei Transmembranhelices und eine Pore besitzen und als neueste Gruppe:
- 3.) Die tandem- oder „two-pore-domain“-Kaliumkanäle (K2P), die vier Transmembranhelices mit zwei porenbildenden Domänen enthalten (Gutman et al., 2003).

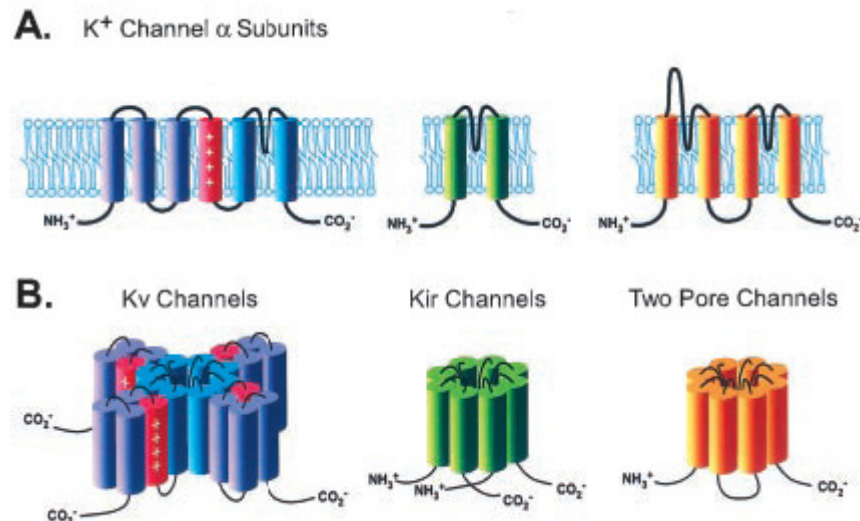


Abb. 1.1 Kaliumkanäle: Darstellung der verschiedenen Anzahl von Transmembranhelices (aus Nerbonne et al., 2001)

Zur dritten Gruppe zählt auch der hier näher untersuchte Kaliumkanal TASK-1. K_2P -Kanäle bilden Homo- und Heterodimere, was die Vielfalt bezüglich ihrer Funktion und Regulation zusätzlich erhöht (Bayliss et al., 2003; Lesage et al., 2000; Cjirjak et al., 2002).

1.1.1 K_2P -Kanäle

K_2P -Kanäle (engl. two-pore-domain potassium channels) sind nicht inaktivierende Kalium-selektive Ionenkanäle, die weder spannungsabhängig noch ligandengesteuert sind und deshalb auch als Hintergrundkanäle (background-/ leak channels) bezeichnet werden (Bockenhauer et al., 2001; Lopes et al., 2001; Kim et al., 2001). Sie sind also nicht nur während des Ruhepotentials, sondern auch während der Depolarisation aktiv. K_2P -Kanäle werden sowohl in erregbaren Zellen, in denen sie die Dauer des Aktionspotentials steuern, als auch in nicht erregbaren Zellen exprimiert (Bayliss et al., 2003). Tandem-Kaliumkanäle zeigen entweder eine schwache oder keine Gleichrichtung. Sie werden aus diesem Grund als entscheidend für die Aufrechterhaltung des Membranpotentials betrachtet (Lesage und Lazdunski, 2000). Die Ionenpermeation folgt den Gesetzen für offenen Gleichstrom im Sinne

der Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung: Sowohl einwärts- als auch auswärtsgerichtete Ionenströme dienen dem Ausgleich der Kaliumionenkonzentration auf beiden Seiten der Zellmembran (Bockenhauer et al., 2001).

Aufgrund von Sequenzhomologien, elektrophysiologischen und regulatorischen Eigenschaften, konnten die bisher bekannten K_2P -Kanäle in fünf Untergruppen mit mindestens 15 Einzelkanälen unterteilt werden (Lesage und Lazdunski, 2000; Bayliss, 2003):

1. TWIK (Tandem of P-domains in a wweak inward rectifier K⁺-channel): Kanäle dieser Gruppe werden durch die Aktivität der Proteinkinase C und Änderungen des intrazellulären pH-Wertes reguliert
2. TASK (TWIK-related acid sensitive K⁺-channel): Kanäle dieser Gruppe werden bereits durch eine geringe Abnahme des pH-Wertes in einem noch physiologischen Bereich gehemmt
3. TALK (TWIK-related alkaline pH-activated K⁺-channel): Diese Kanalgruppe wird bei alkalischem pH-Wert aktiviert
4. TREK (TWIK-related K⁺-channel): Diese Kanäle werden durch ungesättigte Fettsäuren und/oder mechanische Dehnung aktiviert
5. THIK (tandem pore domain halothane inhibited K⁺-channel): Außer der Zuordnung zu den K_2P -Kanälen und der im Namen genannten Eigenschaft ist über diese Kanäle noch wenig bekannt

1.1.2 Veränderungen von Ionenkanälen und ihre klinische Relevanz

In den letzten Jahren konnten in der Humanmedizin Mutationen in diversen Ionenkanalgenen als Ursache zahlreicher Erkrankungen identifiziert werden. Am Herzen erhöhen sogenannte Ionenkanaldefekte das Risiko für Arrhythmien und plötzlichen Herztod. Diese werden häufig im Zusammenhang mit einer Verlängerung des Aktionspotentials und einer Zunahme der regionalen Dispersion der Repolarisation gesehen (Volders et al., 2000; Tomaselli et al., 1994).

So können Mutationen in bestimmten Kalium- und Natriumkanälen zur Manifestation des sogenannten Long-QT-Syndroms (LQTS) (Patel et al., 2009; Kannankeril et al.; 2010) führen. Betroffene Patienten haben ein erhöhtes Risiko für ventrikuläre Arrhythmien (Kammerflattern, Kammerflimmern und Torsades de pointes), die potentiell letal verlaufen können.

Auch das erst seit kurzem bekannte Short-QT-Syndrom (SQTs) birgt durch seine erhöhte Vulnerabilität ein höheres Risiko für einen plötzlichen Herztod durch Kammertachykardien. In

der Literatur wird bislang über fünf SQTs-Gene (SQT1-5, auf den Chromosomen 7, 10, 11, 12 und 17), die als aktivierte Mutationen in Kaliumkanalgenen charakterisiert sind, diskutiert (Patel et al., 2009).

Das Brugada Syndrom (BrS) manifestiert sich meist vor dem 40. Lebensjahr. Dessen Ursache sind in 15 bis 20% der Fälle verschiedene Mutationen des *SCN5A*-Gens eines Na⁺-Kanals (Genlocus: Chromosom 3p21-23) (Napolitano et al.; 2006), die zu einer Reduktion des Natriumstroms und somit zu einer Depolarisationsverzögerung bzw. zu einem Verlust des Aktionspotentials in epikardialen Schichten des rechten Ventrikels führen (Smits et al., 2002; Maron et al., 2006). Antzelevitch et al. (2007) zeigen, dass bei 8,5% der untersuchten Probanden Mutationen der kardialen L-Typ-Ca²⁺-Kanäle vorliegen. Sie sehen einen Zusammenhang zwischen reduziertem Calciumstrom und der Ausbildung des BrS. Da es vermehrt in Ruhe oder im Schlaf zu den lebensbedrohlichen Tachykardien kommt, wird bei der Arrhythmogenese weiterhin eine Dysfunktion des autonomen Nervensystems diskutiert: Ursächlich könnte eine verminderte adrenerge Aktivität mit reduzierter Freisetzung von Noradrenalin in den synaptischen Spalt sein, die sich auf das Myokard überträgt (Meyborg et al., 2003).

Katecholaminerge (stressinduzierte) polymorphe ventrikuläre Tachykardien (CPVT) sind seltene, erbliche, episodisch auftretende Arrhythmien, die bereits im Kindesalter ein hohes Risiko für einen plötzlichen Herztod im Rahmen von körperlicher oder emotionaler Belastung bergen. Bei den genetisch determinierten Varianten sind Mutationen in einem Kanal im sarkoplasmatischen Retikulum (hRyR₂; CPVT-1) bzw. in einem Calcium-bindenden Protein (Calsequestrin 2) CASQ2; CPVT-2) bekannt, die sich auf die elektromechanische Koppelung auswirken (Wehrens et al., 2003 und 2004).

Sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin ist man mit zahlreichen kongenitalen Herzfehlern konfrontiert, die mit einer anhaltenden Volumen- und/oder Druckbelastung des Herzens einhergehen (Harrison et al., 1997). Diese führt zu einer Veränderung der Expression von Ionenkanälen und anderen regulatorischen Proteinen. Dabei kommt es zu einer erneuten Expression des fetalen Genprogramms (zum Beispiel Expression von ANP sowie bestimmter Myosin-Formen) (Borlak und Thum, 2003), welche wiederum zu einer Hypertrophie des Herzmuskels und schließlich zu einer Herzinsuffizienz führt (Näbauer und Kääb, 1998). Umgekehrt kann chronischer hämodynamischer Stress die Ausbildung von kongestiver Herzinsuffizienz bedingen. Die damit assoziierte Hypertrophie des Herzmuskels wird dabei durch Dehnung (Druck- und Volumenbelastung) ausgelöst. Eine durch Dehnung modulierbare Genexpression eines mechanosensitiven Kanals wie TREK-1 wäre ein denkbarer Feedbackmechanismus (Clemo und Baumgarten, 1997).

Eine veränderte Expression von Ionenkanälen findet sich auch als Folge von Ischämie- und Reperfusionseignissen. Das elektrophysiologische Korrelat ist eine Verlängerung des Aktionspotentials und eine Änderung des transmuralen Gradienten (Marban, 2002). Diese Veränderungen sind zwar einerseits als Anpassungsprozess des Herzmuskels zu verstehen, andererseits sind sie auch für die Entstehung von Herzrhythmusstörungen verantwortlich (Swynghedauw et al., 2003).

In den letzten Jahren haben zahlreiche Mausmodelle, bei denen ein Ionenkanal gezielt ausgeschaltet wurde („Knock-out-Modelle“), wesentlich zum pathophysiologischen Verständnis von Ionenkanälen und deren Rolle bei der Entstehung von Herzrhythmusstörungen beigetragen.

1.1.3 TASK-1: Expression, Funktion und Regulation

Der von uns untersuchte TASK-1-Kanal wird überwiegend im Herzen und im ZNS exprimiert (Bayliss et al., 2003). Eine relevante Expression von TASK-1 konnte auch in der glatten Muskulatur von Pulmonal- und Mesenterialarterien, im Glomus caroticum und in Glomerulosazellen der Nebennierenrinde nachgewiesen werden (Buckler et al., 2000; Gurney et al., 2003; Gardener et al., 2004; Cjirjak et al., 2000; Duprat et al., 1997). Mittels RT-PCR konnte außerdem eine Expression in Nieren, Haut, Hoden, Lunge, Dünndarm und Magen gezeigt werden. Ein Nachweis von TASK-1 in der Leber und in den lymphatischen Organen, wie Milz und Thymus, gelang jedoch nicht (Kim et al., 1998; Aller et al., 2008). Im Gehirn ist TASK-1 für die Erregbarkeit von somatischen Motoneuronen und von Körnerzellen im Kleinhirn von Bedeutung (Talley et al., 2000; Millar et al., 2000). Im Herzen scheint TASK-1 zu einem Hintergrund-Strom beizutragen, der zur Aufrechterhaltung des Ruhepotentials, zur Aktionspotentialdauer und zur Repolarisation beiträgt (Kim et al., 1999). TASK-1 wird im Herzen sowohl in den Vorhöfen als auch in den Ventrikeln exprimiert. Allerdings unterliegt die Expression einer entwicklungsabhängigen Regulation: Im Rahmen der frühen Embryonalentwicklung wird TASK-1 im gesamten Myokard exprimiert, während es im weiteren Entwicklungsverlauf hauptsächlich im Erregungsleitungssystem des Myokards nachgewiesen wird (Graham et al., 2006). Anhand von Immunfluoreszenzfärbungen an isolierten Herzmuskelzellen der Ratte konnte die Expression des Kanals an den Disci intercalares und den T-Tubuli nachgewiesen werden (Jones et al., 2002). TASK-1 scheint demzufolge nicht nur membrangebunden, sondern auch intrazellulär exprimiert zu werden.

Die Regulation von TASK-1 erfolgt durch eine Reihe physiologischer und verschiedener pathologischer Signale. Beispielsweise können Hypoxie oder Veränderungen des

extrazellulären pH-Wertes innerhalb physiologischer Grenzen seine Aktivität modulieren: Eine Erniedrigung des pH-Wertes von 7,6 auf 6,4 führt in heterologen Expressionssystemen zu einer 90%igen Hemmung des Kaliumstroms (Duprat et al., 1997). Außerdem wird der TASK-1-Kanal zusätzlich durch humorale Faktoren beeinflusst: In HEK-293-Zellen, die mit TASK-1 und dem Thyreotropin-freisetzenden Hormon (TRH)-R1-Rezeptor kotransfiziert wurden, hemmt TRH den durch TASK-1 durchgeleiteten Strom (Talley et al., 2000), während Angiotensin II TASK-1 in Glomerulosazellen und in Oozyten hemmt, die den Angiotensin-Rezeptor (AT-II 1a) und TASK-1 exprimieren (Czirjak et al.; 2002).

Experimentell wird TASK-1 nicht durch die klassischen Kaliumkanalblocker, sondern durch zweiwertige Ionen wie Zink und Barium gehemmt (Backx und Marban, 1993; Leonoudakis et al., 1998). Noch weitgehend unbekannt sind die intrazellulären Signalkaskaden, die die Regulation von TASK-1 vermitteln. Es ist nachgewiesen, dass die Stimulation bestimmter G-Protein-gekoppelter Rezeptoren TASK-1 hemmt (Millar et al., 2000; Talley et al., 2000; Czirjak et al., 2001). Im heterologen Expressionssystem der Xenopus-Oozyten kann eine Hemmung von TASK-1 durch die Aktivierung von G-Proteinen und Phospholipase nachgewiesen werden, während Signalmoleküle wie Ca^{2+} , Inositol oder Tyrosinkinasen die Aktivität von TASK-1 nicht zu modulieren scheinen. Hinsichtlich der Modulation durch Proteinkinase C gibt es widersprüchliche Erkenntnisse: Während Czirjak (et al., 2001) keine Modulation zeigten, gibt Besana (et al., 2004) an, dass Proteinkinase C eine Inhibition vermittelt. Außerdem kann TASK-1 durch verschiedene pharmakologische Substanzen geblockt werden. Dazu gehören das Endocannabinoid Anandamid und sein stabiles Analogon Methanandamid (Maingret et al., 2001). Zudem werden TASK-1-Kanäle durch klinische Konzentrationen von Inhalationsanästhetika wie Isofluran und Halothan aktiviert (Patel et al., 1999; Sirois et al., 2000; Talley und Bayliss 2002), sie können auch durch Lokalanästhetika, wie Lidocain und Bupivacain, inhibiert werden (Lesage et al., 1996; Leonoudakis et al., 1998).

Die Funktion von TASK-1 ist bislang primär aus neurologischer Sicht am transgenen Mausmodell untersucht worden (Aller et al., 2005). Die untersuchten Tiere zeigten gegenüber ihren unmanipulierten Artgenossen eingeschränkte Motoneuron-Funktionen, die sich in schlechterer Balance und langsamerer Erkundung ihrer Umwelt zeigten. Außerdem wurden Arbeiten zur verzögerten Reaktion auf Hypoxie und normoxische Hyperkapnie infolge der TASK-1-Defizienz im Carotissinus veröffentlicht (Trapp et al., 2008). Heitzmann (et al., 2008) und Davies (et al., 2008) konnten nachweisen, dass TASK-1-defizitäre Mäuse Störungen im Mineralocorticoid-Haushalt aufweisen und das klinische Bild eines Hyperaldosteronismus zeigen.

An isolierten Cardiomyozyten kann durch PAF (Phospholipase C_ε- vermittelt) eine Inhibition von TASK-1 ausgelöst werden. Diese Blockade führt zur Verlängerung des Aktionspotentials und zum Auftreten von sogenannten „early afterdepolarizations“ (Barbutti et al., 2002; Besana et al., 2004). Die Verlängerung des Aktionspotentials durch chemische Substanzen (Methoxamin und A293) führt in patch-clamp-Experimenten zur Verlängerung des Aktionspotentials (Putzke et al., 2007). Dies deutet auf eine zentrale Rolle von TASK-1 für die Stabilisierung der Plateau-Phase des cardialen Aktionspotentials und die Repolarisation von Herzmuskelzellen und damit eventuell für eine Beteiligung dieses Kanals in der Arrhythmogenese.

1.2 Transgene Tiere als Untersuchungsmodell

Die Maus als Vertreter der Säugetiere, der am weitesten entwickelten Klasse der



Vertebraten, stellt einen wichtigen Modellorganismus in der Entwicklungsbiologie und Genetik dar. Die Embryonalentwicklung der Maus dauert ca. 19 Tage, während die Geschlechtsreife bereits nach 9 Wochen erreicht ist. Diese, für ein Säugetier schnelle Entwicklung von der befruchteten Eizelle bis zum geschlechtsreifen Tier, zusammen mit der Möglichkeit, Mäuse mit identischem Erbgut und Eigenschaften zu züchten, sind die Hauptgründe dafür, dass die Maus ein bevorzugtes Modell für molekularebiologische und klassische genetische Analysen geworden ist (Wolpert, 1999).

Abb. 1.2 Titelbild Nature No. 5893, 1982

Die ersten transgenen Mäuse wurden in den siebziger Jahren von Brinster hergestellt (Brinster 1974). Palmiter und Mitarbeitern gelang es 1982 durch Einbringen eines Wachstumshormongens in die Keimbahn der Maus wertvolle Erkenntnisse über die Maus als

transgenes Tier zu erwerben. Da anzunehmen ist, dass in der Maus als Modellsystem alle wesentlichen Mechanismen der Organfunktionen mit denen höherer Säuger vergleichbar sind, insbesondere das Herz- und Kreislaufsystem, hat in den letzten Jahren die Anwendung transgener Tiere in der Grundlagenforschung regulatorischer Genelemente, in der Identifikation der Gen-Funktion mittels Über- und Unterexpression von Genen, in Modellen von menschlichen Krankheiten und in der Toxikologie als Testobjekte (Amman, 2003) rapide zugenommen.

Man aktiviert mithilfe molekulargenetischer Methoden ein bestimmtes Gen oder tauscht es aus. Genauso kann ein bestimmtes Gen überexprimiert und die Auswirkung der funktionellen Konsequenzen auf den Gesamtorganismus untersucht werden. Mithilfe dieses Ansatzes versucht man Ursachen und Konsequenzen von Krankheiten besser zu verstehen (Schrader, 2003). In der Praxis gestaltet es sich häufig schwieriger als hier dargestellt: Es gibt viele gentechnisch veränderte Mäuse, die aufgrund von Entwicklungsfehlern schon im Embryonalalter sterben, noch bevor das Modell für Experimente einsetzbar ist. Ebenso kann eine kompensatorische Hochregulation anderer Gene erfolgen, sodass die genetisch veränderten Tiere funktionell nicht von unmanipulierten Tieren zu unterscheiden sind. Darüber hinaus ist häufig eine geringere (Über-) Lebenskompetenz der veränderten Tiere zu beobachten, auch wenn sich phänotypisch keine signifikanten Unterschiede zu unmanipulierten Tieren nachweisen lassen (Schenkel, 2006).

1.2.1 Herstellung transgener Tiere

Um transgene Mäuse herzustellen, gibt es zwei klassische Methoden, die in vitro durchgeführt werden.

Durch eine Mikroinjektion von definierten klonierten Genkonstrukten in den männlichen Vorkern einer Zygote, die anschließend in eine Amme überführt und ausgetragen wird, entstehen eher zufällige Veränderungen des Genoms. Diese Methode führt bei 10 bis 30% der injizierten Eizellen zur Integration des Transgens ins Genom (Walinski, 2004). Die gezielte Einflussnahme auf ein bestimmtes Gen ist hiermit nicht möglich.

Die zweite Methode heißt (engl.) „gene-targeting“. Meist wird hier mit homologen Rekombinationen gearbeitet. Mit ihr lassen sich definierte Gene gezielt inaktivieren („knock-out“), indem als Targeting-Vektoren homologe Sequenzen verwendet werden, in denen wesentliche Teile verändert oder entfernt wurden (Schenkel, 2006). Durch die Rekombination wird das endogene durch das homologe, künstliche Gen ausgetauscht. Durch positive Selektionsmarker innerhalb der ausgetauschten Gensequenz, beispielsweise

eine Neomycin- oder β -Galaktosidase-Resistenz, können die Zellen, die den Vektor integriert haben, selektiert werden. Diese Vektoren werden über Embryonale Stammzellen (ES) in den Organismus gebracht (siehe Abb. 1.3), da diese Zellen sich zu nahezu jedem Typ von adulten Zellen entwickeln können. Wird ein Gen ausgeschaltet, können die resultierenden Veränderungen in jedem Gewebe der adulten Maus beobachtet werden. Außerdem können ES-Zellen, die im Labor kultiviert wurden, auch noch viele Jahre nach dem Ernten in der transgenen Technologie eingesetzt werden (Walinski, 2004). Die chimären Mäuse, die das veränderte Gen in ihrer Keimbahn integriert haben, tragen bei Weiterzucht bezüglich des veränderten Genoms heterozygote Nachkommen aus. Bei Weiterverpaarung der Nachkommen untereinander wird nach den Mendel'schen Regeln ein Viertel von ihnen das veränderte Gen reinerbig tragen (Gassmann et al., 1998). Das Gen-Targeting wird vielfach zur Herstellung von „Knock-out-Mäusen“ verwendet (Schenkel, 2006), da die homologe Rekombination bei Kenntnis der DNA-Zielsequenz eine gezielte und genaue Ausschaltung dieser Gens ermöglicht.

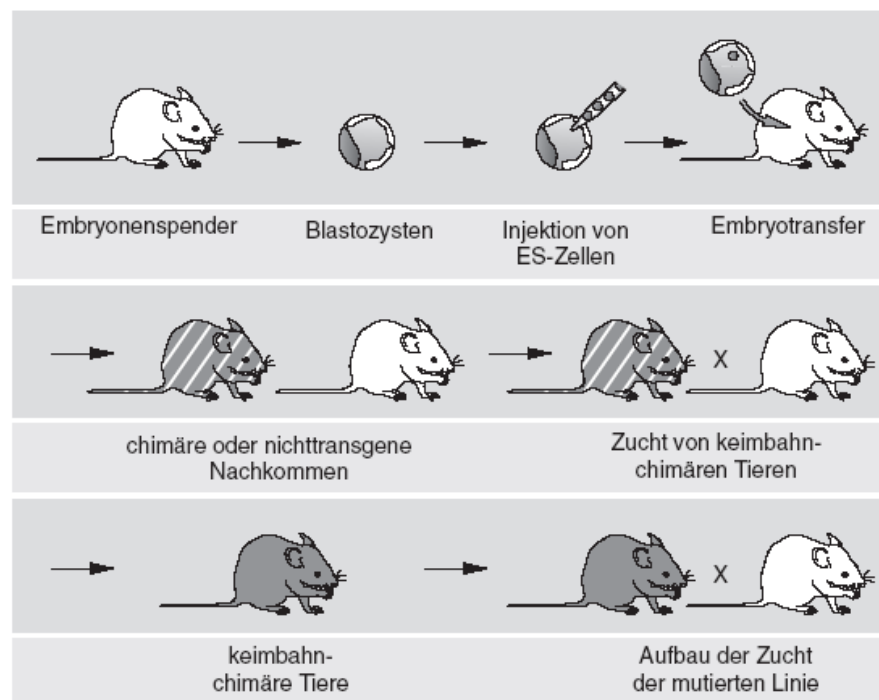


Abb. 1.3 Herstellung transgener Mäuse (aus Schenkel, 2006)

1.2.2 Für Kaliumkanäle genetisch modifizierte Mausmodelle

Bereits 2001 sind über 25 Mausmodelle beschrieben worden, in denen die Expression und Funktion von Kaliumkanälen genetisch verändert wurden (Nerbonne et al., 2001). In patch-clamp-Experimenten konnte auf zellulärer Ebene bei ca. 50% der untersuchten Modelle eine Verlängerung des Aktionspotentials gemessen werden. In vivo kann daraus eine verlängerte QT-Zeit, Arrhythmien, Bradykardien und eine veränderte Herzfrequenzvariabilität resultieren.

In einigen Mausmodellen führte das Fehlen eines bestimmten Kaliumkanals zur Myokardhypertrophie oder zu einem AV-Block, bei dem die Erregungsleitung zwischen den Vorhöfen und Ventrikeln zeitweise verzögert oder unterbrochen war. Es traten, wenn auch selten, extrakardiale Fehlbildungen auf, wie zum Beispiel Gaumenspalten bei Kir2.1-knock-out-Mäusen (Zaritsky et al, 2001). Inzwischen sind über 75 Kaliumkanäle in ihrer Struktur beschrieben (IUPHAR Database, 2011), und zu einer Vielzahl gibt es Mausmodelle zur Untersuchung ihrer Funktion in Herz, Gehirn, Niere oder auch schon ihrer therapeutischen Nutzbarkeit (Buckler, 2010, Sabbadini et al., 2009, Bayliss et al., 2008).

1.2.3 Mutationen von Ionenkanälen und deren Auswirkungen auf den klinischen Phänotyp

Mutationen eines einzelnen Allels können verschiedene Effekte haben. Entweder führen sie dazu, dass die Genexpression zu 50% reduziert wird, oder sie werden durch vermehrte Gentranskription bzw. gesteigerte Biosynthese des intakten Allels kompensiert (Veitia, 2002). Allerdings reicht unter Umständen bereits die Mutation eines Allels aus, um einen Phänotyp zu manifestieren. So verursachen zum Beispiel Mutationen im Allel der beiden Kaliumkanäle KCNQ1 und KCNH2 (HERG) das Krankheitsbild des Long-QT-Syndroms, was zu einer signifikant erhöhten Mortalität führt (Wang et al., 1999; Priori et al., 2003). Durch die Aktivierung kompensatorischer Gene oder aufgrund einer funktionellen Redundanz eines Proteins zeigen sogar homozygote Knock-out-Mäuse in einigen Fällen nur einen geringen oder sogar keinen auffälligen Phänotyp (Gu et al., 2003). Bei Calciumkanal-(Cav1.2.)Knock-out-Mäusen konnte eine kompensatorische Hochregulation des Cav1.3-Kanals nachgewiesen werden. Trotzdem war die Mutation bei der Cav1.2.-Knock-out-Maus bereits während der Embryonalentwicklung letal (Xu et al., 2003). Auch in transgenen Mäusen, bei denen durch die Expression eines Kv1-dominant negativen Konstrukts der $I_{K_{slow1}}$ (Kv1-kodierter Strom) fehlte, wurde kompensatorisch mehr $I_{K_{slow2}}$ (Kv2-kodierter Strom) exprimiert (Zhou et al., 2003). Noch komplexer ist die Situation bei heterozygoten Scn5a-knock-out-Mäusen: Die Expression des Scn5a-Kanals war zwar zu 50% reduziert, gleichzeitig wurde aber die neurohumorale Achse aktiviert, sodass die Knock-out-Tiere eine gesteigerte Herzfrequenz und ein verändertes Expressionsmuster verschiedener anderer Kanäle zeigten (Papadatos et al., 2002). Dennoch scheinen die kompensatorischen Möglichkeiten von Kardiomyozyten limitiert zu sein, was an ihrer hohen Spezialisierung und dem damit einhergehenden Verlust an Pluripotenz liegen könnte.

1.3 Ziel der vorliegenden Arbeit

Nach heutigem Kenntnisstand ist noch keine Ionenkanalkrankheit, die mit Mutationen von TASK-1 assoziiert ist, publiziert worden. Da TASK-1 besonders stark im Reizleitungssystem und im Vorhof exprimiert wird, ist es aber wahrscheinlich, dass Mutationen oder Polymorphismen dieses Kanals bei der Auslösung von Reizleitungsstörungen oder supraventrikulären Arrhythmien eine Rolle spielen (Putzke et al., 2007). Auch die pathophysiologische Rolle der anderen K₂P-Kanäle ist noch weitgehend unerforscht.

Zur kardialen Phänotypisierung der TASK-1-Knock-out-Maus sind für diese Arbeit molekularbiologische (zum Beispiel die RT-PCR sowie der Southern Blot) und zellbiologische Methoden wie der Proteinnachweis mittels Western Blot, verwendet worden. Des Weiteren soll eine elektrophysiologische Methode etabliert werden, mit der anhand des Langendorff-perfundierten Herzens durch Ableiten von Elektromyogrammen (EMG) oder Elektrokardiogrammen (EKG) und Aufzeichnen monophasischer Aktionspotentiale mögliche Veränderungen durch Defizienz des TASK-1-Kanals beschrieben werden können. Denkbare Veränderungen wären zum Beispiel das Auftreten von „early afterdepolarizations“, Herzrhythmusstörungen wie AV-Blocks, ventrikuläre Extrasystolen oder Tachykardien. Eine weitere Methode, die zum Einsatz kommt, ist die Ableitung telemetrischer EKGs in Ruhe (als 24-Stunden-EKG) und unter Belastung, während die Tiere Schwimmen oder sich auf einem Laufband bewegen. Die gewonnen EKG-Daten werden für anschließende Feinanalysen (Herzfrequenzvariabilität) weiter verarbeitet und analysiert. Außerdem werden pharmakologische Provokationsproben mit herzwirksamen Substanzen durchgeführt, und zur Untersuchung pathologischer Situationen werden TASK-1-defiziente und unveränderte Mäuse während und nach Induktion einer lokalen kardialen Ischämie (Myokardinfarkt-Modell) vergleichend untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Tiere

2.1.1 TASK-1 defiziente Mäuse

Die Entwicklung der TASK-1-Knock-out-Maus erfolgte in der Abteilung von Frau Professor Dr. Monyer durch die Arbeitsgruppe um Dr. William Wisden und Dr. Isabel Aller an der Universität Heidelberg, Abteilung für Neurobiologie und Neurologie (Aller et al., 2005). Einzelne Tiere wurden zur Durchführung von Experimenten im Rahmen einer Zusammenarbeit mit der Abteilung für Kinderkardiologie und Pneumologie des Universitätsklinikums Düsseldorf weitergegeben. Außerdem wurden zwei heterozygote Zuchtpaare aus der sechsten Rückkreuzungsgeneration abgegeben und hier zum Aufbau eines entsprechenden Stammes eingesetzt. Alle eingesetzten Tiere entstammen dieser Zucht.

Eine Besonderheit bei der Herstellung der transgenen TASK-1 (-/-) Maus ermöglicht ihre Genotypisierung mittels RT-PCR. Daher wird sie hier kurz zusammenfassend dargestellt: Um die für TASK-1 kodierende Sequenz des Mäusegenoms zu detektieren, wurde durch reverse Transkription aus mRNA des Mäuse-Gehirns mit den Primern 5'-AAG GAC CAG GCG CTG CAG AC-3' (Nukleotide 554-573 sense) und 5'-TGC ACC GTG CCA AGA GGG-3' (Nukleotide 1343-1326, antisense) eine cDNA-Probe hergestellt, mit der eine 129 BAC cDNA Bibliothek durchsucht werden konnte. An dieser Stelle wurde durch homologe Rekombination in embryonalen Mäusestammzellen das Exon 1 des TASK-1 Gens unterbrochen. Der dort eingebrachte klonierende Vektor besteht aus einem 7,3kb langen Grundgerüst des TASK-1 Gens, das mit einer TAG₃IRESLacZpAneopA Kasette (Jones et al., 1997) versehen wurde. Da das Konstrukt im Genom näher zum 5'-Ende (Stromaufwärts/upstream) als geplant eingebaut wurde, ist anschließend noch ein Teil des Exon 1 entfernt worden (erste 21 Aminosäuren, entspricht der „Deletionsstelle“ im Kap.2.1.2.2.: Durchführung RT-PCR).

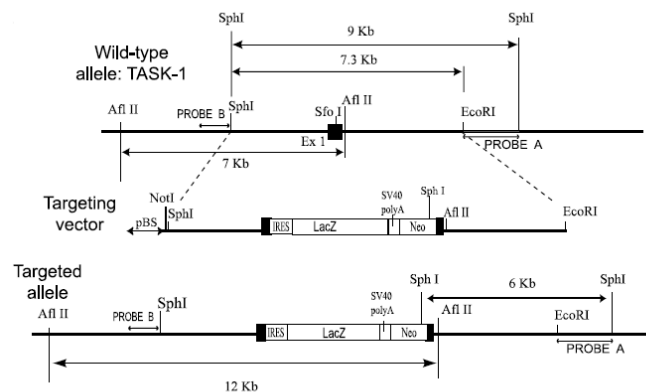


Abb. 2.1 Darstellung der Kassetten und ihrer Position im Genom (aus Aller et al., 2005)

Dieser Vektor wurde anschließend per Elektroporation in embryonale Stammzellen eingebracht und der Erfolg des Einbaus mittels Southern Blot Analyse überprüft.

Die erfolgreich manipulierte Zellen wurden anschließend in C57Bl/6 Blastozysten injiziert und die daraus entstandenen Mäuse künftig mit C57Bl/6-Mäusen verpaart. Die nachfolgend geborenen Mäuse wurden weiterhin mittels Southern Blot auf das Fehlen des TASK-1 Gens überprüft und so genotypisiert. Alle weiteren Zuchtschritte wurden streng auf C57Bl/6-Hintergrund gehalten. Durch Einbau eines 129BAC-Fragments in das C57Bl/6-Genom bleiben die nachgezüchteten Tiere bis zur 10. Rückkreuzungsgeneration formal Chimären, aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit alle Versuche mit Merkmalsträgern (KO oder TASK1^{-/-} Maus) und nicht merkmaltragenden Wurfgeschwistern durchgeführt (TASK-1^{+/+} Maus oder WT). Wenige Untersuchungen schließen auch reine C57Bl/6-Mäuse ein. Bei diesen wird die Stammbezeichnung zur Kenntlichmachung benutzt.

2.1.2 Genotypisierung

2.1.2.1 Southern Blot

Grundlagen

Mit dem generellen Begriff „Blot“ bezeichnet man eine Labormethode, bei der zunächst eine elektrophoretische Auftrennung eines Substratgemisches in einem Gel erfolgt und anschließend die dauerhafte Fixierung des Aufgetrennten auf einer Membran. In Abhängigkeit des getrennten Substrates unterscheidet man Southern (DNA), Western (Proteine) und Northern (RNA) Blots.

Ziel des Southern Blot ist es, DNA-Fragmente durch Hybridisieren mit markierten Sonden nachweisen zu können. Es ist eine relativ einfache, kostengünstige Methode, die allerdings noch immer überwiegend mit radioaktiven Markierungen durchgeführt wird.

Durchführung

Für den Southern Blot muss zunächst aus Gewebe DNA isoliert werden. Dafür wird als Gewebe den Mäusen im Alter von ca. 3 Wochen ein etwa 0,8 cm langes Stück der Schwanzspitze entfernt. Aus diesem wird mittels Lyse mit Proteinase K und Alkohol-Konzentration DNA isoliert, die anschließend mit dem Restriktionsenzym Sph I (Sph I 500 U/ml, Fa. New England Bio Labs, Ipswich, (MA)) verdaut wird. Nach Auftrennung der Fragmente und Übertragung der DNA-Fragmente mittels Kapillarblot auf eine positiv geladene Nylonmembran (Zeta-Probe® GT, Fa. BIO-RAD, Hercules (CA)), erfolgt die Hybridisierung mit Probe A (freundlicherweise von Frau Dr. Aller zur Verfügung gestellt) und die radioaktive Markierung mit α^{32} Phosphor. Abschließend wird die markierte Membran zur Belichtung eines Röntgenfilms eingesetzt. Die homozygoten Merkmalsträger lassen sich durch Nachweis einer 6 kb-Bande erkennen, während die Wildtyp-Mäuse eine 9 kb-Bande zeigen. Heterozygote Tiere weisen beide Banden auf:

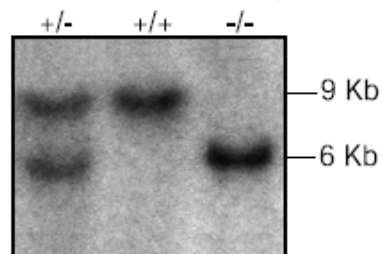


Abb. 2.2 Beispiel Southern Blot (aus Aller et al., 2008)

Um das Genotypisierungsverfahren effizienter zu gestalten und den Umgang mit radioaktiven Stoffen zu minimieren, wurde eine Methode zur Genotypisierung mittels PCR entwickelt.

2.1.2.2 Real-Time PCR

Grundlagen

Die PCR (engl. Polymerase Chain Reaction) ist ein molekulargenetisches Verfahren zur Amplifikation selektiver DNA-Sequenzen. Mithilfe der PCR kann ein spezifischer DNA-Doppelstrang in vitro enzymatisch vervollständigt werden. Voraussetzung hierfür ist die

Kenntnis über einen kleinen Teil der Nukleotidsequenz einer Matrizen-DNA, auch flankierender Sequenzbereich genannt. Synthetisch hergestellte, sequenzspezifische Oligonukleotide fungieren als Primer und dienen somit als Start-Punkt der DNA-Synthese. Die Elongation der Primer wird durch thermostabile Taq DNA-Polymerase katalysiert. Die hier verwendete Real-time PCR erlaubt die Messung der entstehenden PCR-Produkte bereits während eines PCR-Laufs mit Hilfe von fluoreszenzmarkierter Basen (Sagner et al., 1999). Sie dient vor allem dem semiquantitativen Nachweis von Reaktionsprodukten und wird darum in der Fachliteratur auch als real-time-quantitative PCR (RTQ-PCR) bezeichnet. Mithilfe von interkalierenden Farbstoffen ermöglicht die Real-time PCR eine Quantifizierung der eingesetzten DNA, cDNA oder RNA-Menge. Farbstoffe, wie zum Beispiel SYBR®Green, binden (interkalieren) an doppelsträngige DNA und bilden einen Fluoreszenz-Farbstoff-Komplex, der blaues Licht bei einer Wellenlänge von $\lambda_{\text{max}} = 494\text{nm}$ absorbiert und grünes Licht $\lambda_{\text{maxi}} = 521\text{nm}$ emittiert. Mit jedem Reproduktionszyklus nimmt die Menge an Target-DNA mit dem eingebautem Farbstoff zu und damit auch die Intensität der nach jedem Zyklus gemessenen Fluoreszenz. SYBR®Green I (Qiagen® GmbH, Hilden) ist ein asymmetrischer Cyanin-Farbstoff, im Vergleich zu dem älteren Ethidiumbromid ist es weniger toxisch und bindet mit einer ca. 100-fach stärkeren Affinität an doppelsträngige DNA. Bei der Verwendung von interkalierenden Farbstoffen ist es von Vorteil, dass die kostenintensive Synthese und Markierung von sequenzspezifischen Sonden entfällt, sowie ein universeller Einsatz für die Quantifizierung verschiedener Proben möglich ist, ohne dass die Zugabe eines sequenzspezifischen Fluoreszenzfarbstoffes erforderlich wird.

Durchführung/ PCR-Design

Im vorliegenden Fall ist eine Identifizierung genetisch veränderter Individuen (homozygote TASK-1 (-/-) Mäuse und heterozygote Mäuse) durch den Nachweis des LacZ-Gens in der eingebrachten Kasette möglich. Außerdem fehlen bei diesen Tieren auch die ersten 21 Basenpaare im Exon 1, die gesondert entfernt wurden (siehe 2.1.1). Der Nachweis dieser deletierten Basenpaare darf also nur bei Wildtypen und ebenso bei heterozygoten Mäusen möglich sein. Somit ergibt sich für jeden Genotyp ein typisches Amplifikationsmuster:

TASK-1 (-/-)	positives Signal für LacZ, keine Amplifikation der Basenpaare in der Deletionsstelle
TASK-1 (+/+)	Nachweis der Basenpaare aus Exon 1, keine Amplifikation von LacZ
Heterozygote	sowohl positiv für LacZ als auch für die Basenpaare aus Exon 1

Für das Gelingen entscheidend ist hierbei das optimale Primerdesign, da gerade im Bereich der Deletionsstelle nur eine relativ kurze flankierende Sequenz zur Verfügung stand und

dieser Bereich zudem eine große Ähnlichkeit mit dem TASK-3-Gen zeigt. Die Gensequenzen des LacZ-Gens und des TASK-1-Gens wurden über ENTREZ-NCBI (National Center for Biotechnology, USA) gesucht. Für das TASK-1-Gen erfolgte anschließend die Suche der Exon-1-Sequenz über Ensembl (http://www.ensembl.org/mus_musculus/index.html). Im Exon-1 konnte nun die folgende von Wisden und Aller beschriebene Deletionsstelle des TASK-1-Gens gekennzeichnet werden:

3'-agg acc cgg agg gac gat gaa gcg gca gaa tgt gcg cac gtt ggc tct cat cgt gtg cac ctt cac cta cct gct ggt ggg-5'

Anschließend erfolgt das Primerdesign mit „Primer Express 2.0“ der Firma Applied Biosystems®. In einem ersten Schritt wurden die ermittelten Gensequenzen in das Programm überführt. Die Festlegung der folgenden standardisierten Parameter erfolgte in einem zweiten Schritt:

Schmelztemperatur (T_m)	58 – 60 °C
min./ max./ optimale Primerlänge	9/ 40/ 20 Nukleotide
Ampliconlänge	50 – 100 Basenpaare
GC- Gehalt	40 – 60%

Für das Deletionsprimerpaar war zusätzlich ein dritter Schritt erforderlich, in dem die Primersuche auf den Bereich des Exon-1 (513bp insgesamt, davon 282 codierend) eingeschränkt wurde. Durch das Programm wurden einige mögliche Primerpaare ermittelt, die in zahlreichen Vorversuchen in der Etablierungsphase auf Spezifität, Sensitivität und Reproduzierbarkeit getestet wurden. Eine erfolgreiche Genotypisierung mit Bestätigung der Ergebnisse im Southern Blot, gelang schließlich mit folgenden Primerpaaren:

Gen	Gene-ID	Primer forward	Primer reverse
LacZ	945006	5'-ccc att acg gtc aat ccg c-3'	5'-aca acc cgt cgg att ctc c-3'
Del TASK-1	16527	5'-aga atg tgc gca cgt tgg c-3'	5'-cgg cgc cca cca gca-3'

Alle Primer wurden über die Firma MWG-Biotech AG (Anzingerstr, 7a; 85560 Ebersberg; <http://www.mwg-biotech.com>) in einer Konzentration von 0,2µmol pro Oligonukleotid bezogen. Nach Herstellerangaben wurden die lyophilisierten Primer zunächst in einem vorgegebenen Volumen RNase-freiem Wasser zur Herstellung einer konzentrierten Stammlösung gelöst. In einem nächsten Schritt wurden aliquotierte Arbeitslösungen hergestellt, um wiederholtem Auftauen/Einfrieren und Kontaminationen vorzubeugen. Die Primerlösungen wurden bis zur Verwendung bei –20 °C gelagert.

Für die PCR wurden außerdem fertige Reaktionslösungen (SYBR®Green PCR-Kit Qiagen® #204143; Fa. Qiagen, Hilden) eingesetzt.

2.1.3 Tierhaltung

Alle Mäuse wurden in der zentralen Tierversuchsanlage der Universität Düsseldorf gehalten. Den nicht dort geborenen Tieren (insgesamt 4 für Experimente und 4 Zuchttiere) wurde eine mindestens 14-tägige Adaptationsphase vor Beginn weiterer Maßnahmen eingeräumt.

2.1.3.1 Zucht

Die Zuchtpaare wurden in Makrolonkäfigen Typ II (350 cm³, Höhe 14 cm) oder Typ III (800 cm³, Höhe 14 cm) auf entstaubtem Weichholzgranulat gehalten. Als Rückzugsmöglichkeit und zum Nestbau wurde ihnen ein Häuschen zur Verfügung gestellt. Im Alter von 3 Wochen wurden die Jungen abgesetzt und nach Geschlechtern getrennt in Geschwistergruppen gehalten. Beim Umsetzen wurden zugleich ihre Schwanzspitzen zur DNA-Analyse gekürzt und eine individuelle Markierung mittels Ohrlochung vorgenommen. Nach Bestimmung des Genotyps und mit Erreichen der Geschlechtsreife wurden die Tiere in das Versuchsprogramm aufgenommen oder verpaart. Nach Möglichkeit wurden heterozygote Geschwister miteinander verpaart, um homozygote Merkmalsträger zu erhalten. Außerdem wurden parallel C57Bl/6-Mäuse eingekreuzt, um die Linienführung zu verbreitern. Um die Ausbeute an Merkmalsträgern zu erhöhen, wurden auch einige homozygot TASK-1-defiziente Mäuse in der Zucht belassen und sowohl mit heterozygoten als auch mit homozygoten Geschwistern angepaart. Der Zuchterfolg (Wurfstärke/ überlebende Welpen) wurde mittels Zuchtbuch und Nachverfolgung der Mortalitätsraten für jeden Genotyp überprüft.

Die Raumtemperatur in den Zuchträumen lag bei 22 +/- 2°C, die relative Luftfeuchte bei 55 +/- 5% und die Beleuchtung (320 Lux) fand von 06:00 Uhr bis 18:00 Uhr MEZ statt. Die Mäuse wurden mit pelletiertem (15mm Durchmesser), autoklaviertem Futter namens „ssniff M-Zucht“ ad libitum gefüttert. Zur Wasserversorgung wurde ozonisiertes, mit HCl angesäuertes Leitungswasser (pH 2,6 bis 3,0) aus Tränkflaschen zur freien Verfügung angeboten.

2.1.3.2 Versuchstiere

Die Versuchstiere wurden bis zum Operationstag zusammen mit den Zuchttieren gehalten. Nach erfolgter Transmitter-Implantation wurden sie einzeln in Makrolonkäfigen Typ II gesetzt, und ihnen wurde ein autoklaviertes Stück Zellstoff als Nestersatz angeboten. Streu und Wasser entsprachen dem der Zuchttiere, ebenso die Temperatur- und Luftfeuchtwerte.

in den Tierräumen. Als Futter wurde den Tieren „ssniff R/M-Haltung“ angeboten. Um eine spätere Belastung der Tiere in deren aktiver Tageszeit zu ermöglichen, wurde die Belichtung von 02:00 Uhr bis 14:00 Uhr MEZ (ohne Berücksichtigung der Sommerzeit) als reverser Tag-/Nacht-Rhythmus durchgeführt.

2.1.4 Genehmigung

Das Versuchsvorhaben wurde unter den Kennziffern G86/05, O3/02, A/14/2007 und G29/06 von der Bezirksregierung Düsseldorf genehmigt.

2.2 Western Blot

Der Proteinnachweis mithilfe des Immunoblots oder Western Blots dient der Erfassung möglicher Unterschiede in der Protein-Expression verwandter Kaliumkanäle bei den TASK-1-defizienten Mäusen und ihren Wurfgeschwistern.

Er besteht im Wesentlichen aus 5 Schritten:

- 1.) Proteinextraktion aus Gewebe
- 2.) Elektrophoretische Auftrennung des Proteingemisches
- 3.) Proteintransfer auf eine Membran (Blot)
- 4.) Kopplung eines spezifischen Antikörpers an das gesuchte Protein und
- 5.) Sichtbarmachung durch Chemilumineszenz
- 6.) Zusätzlich kann eine endogene Kontrolle durchgeführt werden.

2.2.1 Proteinextraktion

Die Gewinnung des Proteinlysats erfolgt aus ganzen Mäuseherzen, die nach Entnahme in PBS (Phosphate Buffered Saline Solution) vollständig blutleer gespült werden. Anschließend wird das Herz in rechte und linke Hälfte geteilt (jeweils Vorhof mit Kammer) und jede Herzhälfte unter Zugabe von flüssigem Stickstoff zu Gewebepulver zerrieben. Dieses wird in zwei Eppendorff-Gefäße überführt und mit jeweils 1ml Lysepuffer versetzt und geschüttelt. Anschließend wird der Lysevorgang über 1 Stunde im eisgekühlten Ultraschallbad fortgesetzt. Danach werden die Proben zentrifugiert und der gewonnene Überstand gekühlt aufbewahrt. Zur Konzentrationsbestimmung werden die Proben zunächst mit aqua millipore 1:10 verdünnt, dann werden als Dreifachbestimmung jeweils 5µl mit 795 aqua millipore in Küvetten pipettiert und je 200µl Bio-Rad-Protein-Assay, basierend auf der Methode von

Bradford, hinzugegeben und gründlich gemischt, sodass keine Phase mehr erkennbar ist. Als Referenzwert dient eine Küvette mit 800µl Bradford-Lösung.

Die Protein-Konzentrationsbestimmung mittels Bradford-Assay basiert auf dem Wechsel des Absorptionsmaximums des verwendeten Farbstoffs (Triphenylmethan-Coomassie-Brillant-BlauG250) bei Bindung an Proteinen. Die Bildung des Farbstoff-Protein-Komplexes kann mit hoher Empfindlichkeit gegen das ungebundene Farbreagens gemessen werden, da der Extinktionskoeffizient des Komplexes wesentlich höher ist. Die Extinktion der Lösung wird im Photometer bei 595nm gemessen und die Konzentration nach folgender Formel berechnet:

$$\begin{array}{ccccccc} \text{Konzentration der Probe} & = & \text{Extinktion bei 595 nm} & \times & \text{Verdünnung} & \times & \text{Faktor des Gerätes} \\ (\mu\text{g}/\mu\text{l}) & & (\text{Mittelwert von 3 Proben}) & & (10) & & (3,9) \end{array}$$

In der Gelelektrophorese wird eine 50 µg Probe je Einzelbestimmung eingesetzt und jede Probe in Doppelbestimmung analysiert. Die Proben werden zu 100 µg aliquotiert, jede Probe mit 15 µl Sample Buffer versetzt und anschließend direkt eingesetzt oder zum späteren Gebrauch bei –20°C tiefgefroren.

2.2.2 Elektrophoretische Auftrennung des Proteingemisches

Um das zu bestimmende Protein aus der Proteinlösung zu isolieren, macht man sich in der Gelelektrophorese das spezifische Gewicht der Proteine zunutze. Dazu werden je 50 µg Probe je Einzelbestimmung mit Sample Reducing Agent versetzt und durch die Zugabe von aqua millipore alle auf das gleiche Probenvolumen (25 µl) ergänzt. Anschließend werden sie bei 500 rpm, 10 Minuten und 80 °C in den Thermomixer gegeben um Sekundär- und Tertiärstruktur durch die Lösung ihrer Wasserstoffbrücken aufzubrechen. Die Proben werden erneut gründlich gemischt und anschließend auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen.

Gelsysteme, wie das hier beschriebene System von Invitrogen NuPAGE, verwenden die Puffersubstanz Bis-Tris, die einen pH-Wert von 6,4 sowohl im Sammel- als auch im Trenngel aufweisen. Durch diesen niedrigen pH-Wert wird der Zerfall des Polyacrylamids verhindert und das Gel über lange Zeit lagerfähig gemacht. Außerdem besitzt dieses Gelsystem einen großen Auftrennungsbereich, der durch Zugabe von MES oder MOPS im Laufpuffer noch verändert werden kann. Unter Einfluss des elektrischen Felds wandert die Mischung der zu trennenden Makromoleküle durch ein 4 bis 12%-iges Bis-Tris-Gel. Dieses hängt in einer ionischen Pufferlösung in einer Xcell SureLock Mini-Cell Gelkammer (Invitrogen). An beiden Enden sind Elektroden angebracht, an die eine Spannung von 200 Volt angelegt wird. Als

Pufferlösung wird der NuPAGE MOPS SDS Running Buffer nach Anleitung eingesetzt. Das SDS lagert sich an die Proteine an und denaturiert sie. Die Sulfatgruppen des daraus resultierenden Komplexes sorgen für eine gleichmäßig verteilte negative Ladung der Proteine, sodass die Laufgeschwindigkeit im Gel jetzt nur noch von der Proteingröße und nicht mehr von der Ladung abhängig ist. Jedes Protein wandert von der Kathode zur Anode. Kleinere Moleküle wandern am schnellsten in Richtung der positiv geladenen Anode, während die großen Moleküle langsamer sind. Die Laufzeit dieses Gels beträgt bei 200V ungefähr 45 min.

2.2.3 Proteintransfer auf eine Membran (Blot)

Der Transfer der nach ihrer Größe getrennten Proteine auf eine feste Matrix, in diesem Fall eine Nitrocellulosemembran, heißt „Blotten“. Durch die Übertragung der zu identifizierenden Substanzen aus dem Gel werden weitere Nachweisreaktionen ermöglicht, die im Trenngel schwierig oder unmöglich durchzuführen wären. Dabei macht man sich die negative Ladung der Proteine zunutze: indem man sie in der Apparatur näher an die Kathode platziert als die Nitrocellulosemembran, die sie aufnimmt (siehe Abb. 2.3).

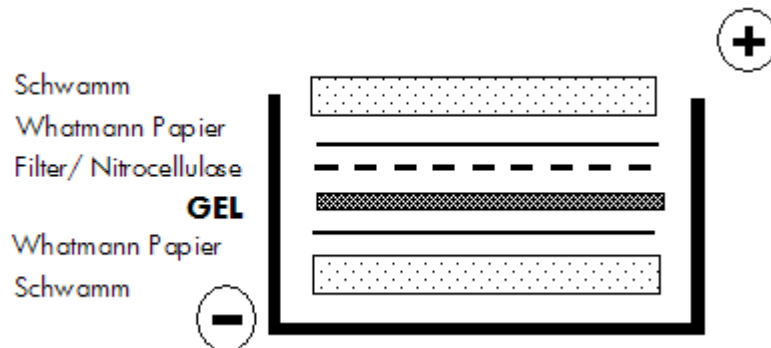


Abb. 2.3 Aufbau des Blottings

Durch das Anlegen einer Spannung von 30 Volt wandern die hier nachgewiesenen Proteine in Richtung des positiven Pols (Anode) und treten innerhalb einer Stunde auf die Membran über. Die erfolgreiche Übertragung auf die Membran kann durch eine reversible Färbung mit Ponceau S sichtbar gemacht werden.

2.2.4 Kopplung eines spezifischen Antikörpers an das gesuchte Protein

Die fest auf der Membran verankerten Proteine werden durch spezifische Antikörper, die gegen jeweils ein Epitop des Proteins gerichtet sind, nachgewiesen. Diese Reaktion funktioniert nach dem „Schlüssel-Schloss-Prinzip“ und hat daher eine große Spezifität.

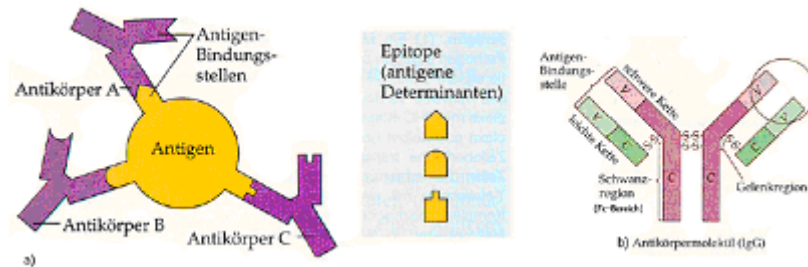


Abb. 2.4 a.) Antigen-Antikörper Bindungsstellen b.) Aufbau eines Antikörpermoleküls (aus Campbell, 2001)

Um zusätzlich unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, wird die Membran zuerst mit einer Proteinlösung (Milchpulver oder Esel-Serum) blockiert, bevor mit Antikörpern weitergearbeitet wird. Dadurch wird sichergestellt, dass die Erst-Antikörper sicher an ihr spezifisches Gegenstück binden. Außerdem wird die Spezifität des Erst-Antikörpers durch das Einsetzen eines individuellen Blocking-Peptids gesichert. Dabei handelt es sich um die gegen den Erst-Antikörper gerichteten Peptide, die zu einem Teil der Antikörperlösungen hinzugegeben werden. Durch die Bildung eines Antikörper-Peptid-Komplexes kann der Erst-Antikörper auf der Membran keine Reaktion mehr auslösen. Alle eingesetzten Antikörper wurden vorab auf die optimale Verdünnung getestet, wobei sich folgende geeignete Arbeitsverdünnungen ergaben.

TASK-1, goat, anti-human	Santa Cruz #sc-32067	} 1 : 200
	Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA, USA	
TASK-1, rabbit, anti-human	Chemicon #AB5250	
	EMD Millipore Corporation, Billerica ,MA, USA	
TREK-1, goat, anti-human	Santa Cruz #sc-11556 (s.o)	} 1 : 800
TWIK-2, goat, anti-human	Santa Cruz #sx-11486 (s.o.)	
TASK-1, goat, anti-human	Aviva #ARP 35090_T100	
	Aviva Systems Biology, San Diego, CA, USA	

Die eingesetzten Blockingpeptide werden grundsätzlich in der 5-fachen Konzentration des Erstantikörpers eingesetzt.

Blockingpeptide:

TASK-1, goat, anti-human	Santa Cruz #sc-32067P (s.o.)
TASK-1, goat, anti-human	Santa Cruz #sc-11556P (s.o.)
TWIK-2, goat, anti-human	Santa Cruz #xe-11486P (s.o.)

Für die TASK-1-AK (Chemicon und Aviva) werden die Blockingpeptide mit dem Antikörper zusammen geliefert und haben keine gesonderte Bestellnummer.

Die Membran wird mit der entsprechenden Erstantikörper-Lösung überschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert, um eine sichere und möglichst vollständige Bindung zu ermöglichen. Anschließend erfolgt ein Waschschrift in 1x TBS/Tween um ungebundene Antikörper zu entfernen.

2.2.5 Sichtbarmachung der Reaktion durch Chemolumineszenz

An den stabilen Protein-Antikörper-Komplex wird im nächsten Arbeitsschritt ein enzymkonjugierter Zweitantikörper gebracht, der eine chemische Reaktion zur Entwicklung von Lumineszenz katalysiert. Das dazu verwendete Enzym heißt Meerrettich-Peroxidase (Horseradish-Peroxidase, HRP), es setzt Luminol in seine oxidierte, lumineszente Form um:

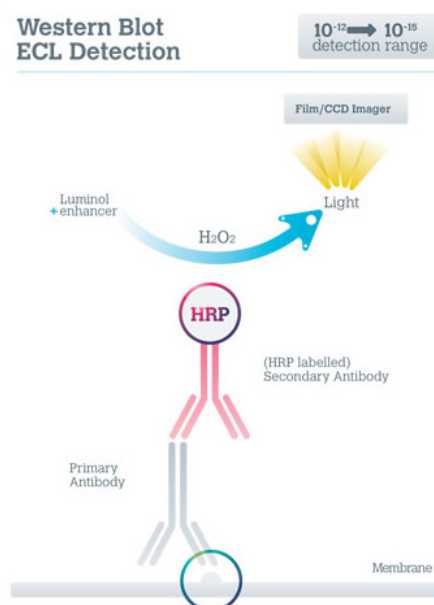


Abb. 2.5 ECL-Reaktion (aus: crb Newsletter May 10)

Der Zweitantikörper ist spezifisch gegen die Fc Bereiche des Erstantikörpers gerichtet. Er wird in einer Verdünnung von 1:10000 eingesetzt. Anschließend wird mit Hilfe von Luminol (ECL) die bereits beschriebene Reaktion ausgelöst und die entstehende Lumineszenz zur Schwärzung eines Röntgenfilms genutzt.

Zweitantikörper:

HRPO, donkey, anti-goat	Dianova, 705-035-147, Dianova GmbH, D-20354 Hamburg
HRPO, goat, anti-rabbit	Chemicon #AP132P (s.o.)

2.2.6 Endogene Kontrolle

Die bisher beschriebenen Arbeitsschritte ermöglichen die qualitative Analyse eines Proteins. Durch die spezifische Antigen-Antikörperreaktion und den Nachweis der Proteingröße anhand des Vergleiches mit dem geeichten Marker ist es möglich, ein bestimmtes Protein zu identifizieren. Um Aussagen hinsichtlich der Proteinkonzentration im Ursprungsgewebe oder im Vergleich zu anderen Proteinen zu treffen, müssen weitere Analysen erfolgen. Da es sich in der vorliegenden Arbeit um die Fragestellung handelte, ob ein bestimmtes Kanalprotein überhaupt vorhanden (TASK-1 bei TASK-1 (-/-) Mäusen im Vergleich zu Wildtypen) oder ein Eiweiß stärker exprimiert ist (TWIK-2; TREK-1 bei TASK 1 (-/-) Mäusen im Vergleich zu TASK-1 (+/+) Mäusen), also ob eine komparative oder semi-quantitative Aussage zu treffen ist, kann eine relative Quantifizierung durch einen sogenannten „Housekeeper“ erfolgen.

Als „Housekeeper“ werden in diesem Fall Proteine bezeichnet, die unabhängig vom Zelltyp, Zellstadium und äußeren Einflüssen in allen Zellen vergleichbar stabil exprimiert werden und darum als interner Standard oder endogene Kontrolle fungieren können. Beispiele sind β -Actin (ACTB), β -Glukuronidase (GUS), Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT), PTATA box binding Protein (TBT) und die hier verwendete Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH). Indem in allen Proben die gleiche Menge an GAPDH nachzuweisen ist (erkennbar an der Intensität der Röntgenfilm-Schwärzung), ermöglicht eine Abstufung der Schwärzung bei der ersten Nachweisreaktion vergleichende Aussagen zu Konzentrationsunterschieden der einzelnen Proteine (zum Beispiel TASK vs. TREK). Je stärker die Schwärzung, desto höher die Proteinkonzentration in der jeweiligen Probe.

Es ist grundsätzlich möglich, diesen Arbeitsschritt in die oben beschriebene Vorschrift einzugliedern, indem zur Erst-Antikörper-Inkubation sowohl der nachzuweisende Erst-Antikörper (zum Beispiel TASK-1) als auch der Housekeeper (zum Beispiel GAPDH) gemeinsam eingesetzt werden. Da die Molekulargewichte der untersuchten Kaliumkanäle

aber zur GAPDH sehr nahe liegen, besteht bei dieser Vorgehensweise eine Verwechslungsgefahr, bzw. bei schlechter Auftrennung des Proteingemisches ist es möglich, dass beide Reaktionen sich überlagern. Um diese Problematik zu umgehen, wurde die Membran nacheinander mit den jeweiligen Erst-Antikörpern inkubiert. Dabei macht man sich zunutze, dass auf Nitrozellulose fixierte Proteine dort eine sehr viel festere Bindung aufweisen als die in den nachfolgenden Reaktionen gewonnenen Antigen-Antikörper-Bindungen. Mit geeigneten Lösungen (ReBlot Mild, 1:10 verdünnt) können also Letztere entfernt werden (10 Minuten bei RT waschen) ohne die Verankerung des Proteins anzugreifen. Durch diesen Arbeitsschritt (das sogenannte „strippen“) gewinnt man nach Durchlaufen der ersten Nachweisreaktion die Membran auf dem Status zurück, die sie nach dem blotten innehatte und kann mit der exakt gleichen Probenkonstellation die Quantifizierung an einem Housekeeper vornehmen. Dafür wurden die bereits beschriebenen Reaktionsschritte (Blocken, Erst-Antikörper-Inkubation etc.) noch einmal durchlaufen, allerdings mit dem Einsatz von GAPDH als erstem Antikörper.

Verwendete Antikörper

GAPDH, mouse, anti-mouse	Fa. Biodesign, CAT #H86504M Clone 6C ₅ Memphis; TN 38134; USA
HRPO, anti mouse IgG from sheep	GE Healthcare #NA ₉₃₁ V D-79111 Freiburg

Weitere verwendete Lösungen, Geräte:

Gelkammer:	Xcell SureLock Mini-Cell Gelkammer (Invitrogen Life technologies, D-64293 Darmstadt)
Stromquelle:	PowerPac 200 (Blot) und PowerPac 300 (Elektrophorese) BioRad Laboratories GmbH, D-80901 München
Bradford Solution	BioRad Cat #500-0006 (s.o.)
Complete Mini	Roche #04693124001 (pro 10ml RL-Puffer 1 Tablette CompleteMini dazugeben) Roche Deutschland Holting GmbH; D-79639 Grenzach -Wyhlen
Dulbeccos' s PBS (1x)	PAA #H15-001 PAA Laboratories/ A&E Scientific; F-78130 Les Mureaux
Lyse Puffer:	500µl 2M Tris (pH 7,4) # 5429.1 1400µl 5M NaCl #P029.1 21mg NaF #2618.1
<div style="display: flex; align-items: center; justify-content: center;"> <div style="font-size: 3em; margin-right: 10px;">}</div> <div> Carl Roth GmbH, D-76231 Karlsruhe </div> </div>	

0,22g Na-Pyrophosphat (x10 H ₂ O) #T883.1	} Carl Roth (s.o.)
0,5ml Triton-X-100 #3051.3	
100µl 0,5M EDTA #8040.1	
100µl 0,5M EGTA #3054.1	
10mg Na-Vanadat #A2196.0005; AppliChem GmbH	
	D-64291 Darmstadt
0,22g β-Glycerophosphat #50020-100G; Sigma Aldrich,	
	D-89555 Steinheim
ad 50ml aqua dest.	

Full Range Rainbow Marker

Amersham #RPN800

GE Healthcare; D-79111 Freiburg

Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder

Fermentas #SM1811

Thermo Fisher Sci., Waltham, USA

Milipore-Wasser (Aqua trides.)

NuPage LDS Sample Buffer (4x)

Invitrogen #NP0007

NuPage MOPS SDS R. Buffer (20)

Invitrogen #NP0001

NuPage Novex Bis-Tris Gel, 4-12%

Invitrogen #NP0321

NuPage Sample Reducing Agent (10x=
Methanol, p. a. (pro Analysis)

Invitrogen #NP0004

Merck #1.06009.2500

Merck KgaA, D-64293 Darmstadt

Nitrocellulosemembran

Bio-Rad # 162-0145

BioRad Laboratories GmbH, (s.o.)

Normal Donkey Serum

Dianova #017-00-121

Dianova GmbH (s.o.)

NuPAGE Antioxidant

Invitrogen #NP0005 (s.o.)

NuPage Transfer Buffer (20x)

Invitrogen #NP0006 (s.o.)

Ponceau S solution

Serva #33427.01

Serva Electrophoresis GmbH, D-69115

Heidelberg

10x TBS/Tween:	21,1g Tris HCl	#9090.3; Carl Roth GmbH (s.o.)
	11g Tris Base	#5429.4 ; Carl Roth GmbH (s.o.)
	73g NaCl	#S-9888; Sigma Aldrich (s.o.)
	ad 1l aqua millipore, pH 7,5	
	10 ml 100 % Tween 20	#P1379; Sigma Aldrich (s.o.)
1x TBS Tween:	100 ml 10x TBS/Tween	
	900 ml aqua millipore	
NuPage ReBlot mild		Invitrogen #2502 (s.o.)
Whatman Chromatography Paper		Fisher Scientific # 3030931
		D-58239 Schwerte
Hyperfilm ECL		GE Healthcare / Amersham #RPN3103K (s.o.)
Western Lightning Chemiluminesce Plus		Chemicon #2502 (s.o.)

2.3 Versuche am isolierten Herzen/Langendorff-Präparation

2.3.1 Grundlagen

Die Ableitung monophasischer Aktionspotentiale (MAP) wurde bereits 1882 von Burdon-Sanderson und Page erstmals beschrieben (Burdon-Sanderson et al; 1882). Indem sie eine Elektrode auf die intakte Oberfläche und eine zweite auf eine verletzte Stelle des Herzens platzierten, konnten sie die unterschiedlichen elektrischen Phasen des Herzschlags dokumentieren. Später gelang diese Ableitung auch an intaktem Herzgewebe (Jochim et al., 1935), und Anfang der 1980er Jahre wurden von Franz (1999) Kontakt-Elektroden für die Anwendung am menschlichen Herzen entwickelt, deren grundsätzlicher Bauplan die Grundlage für die in dieser Arbeit verwendeten Elektroden bildet. Unter Verwendung einer afferenten Elektrode, die aufgrund ihrer geringen Größe die Potenzialänderung eines möglichst kleinen Gebietes, im Idealfall einer Herzmuskelzelle, und einer efferenten Elektrode, die diese Potenzialänderung in Relation zum direkt umliegenden Herzgewebe setzt, gelingt es, die Potenzialverschiebung über die Herzoberfläche sichtbar zu machen, die in Zeitverlauf und Aussehen transmembranösen Aktionspotentialen (TAP) gleichzusetzen sind (Knollmann et al., 2001). Dadurch sind sie zur Untersuchung insbesondere der Repolarisationszeit geeignet und können als Brücke zwischen der elektrophysiologischen Untersuchung an isolierten Einzelzellen („Patch-Clamp-Experimente“) und der klinischen Elektrophysiologie und Arrhythmieforschung dienen (Franz, 1999).

Das murine MAP zeichnet sich im Vergleich zu dem anderer Säuger durch das Fehlen einer typischen Plateauphase aus. Stattdessen wird der Übergang von schneller zu langsamer Repolarisation durch eine Schulter oder Flanke charakterisiert (siehe auch Kap. 2.3.3.1. Qualitätskriterien für MAP):

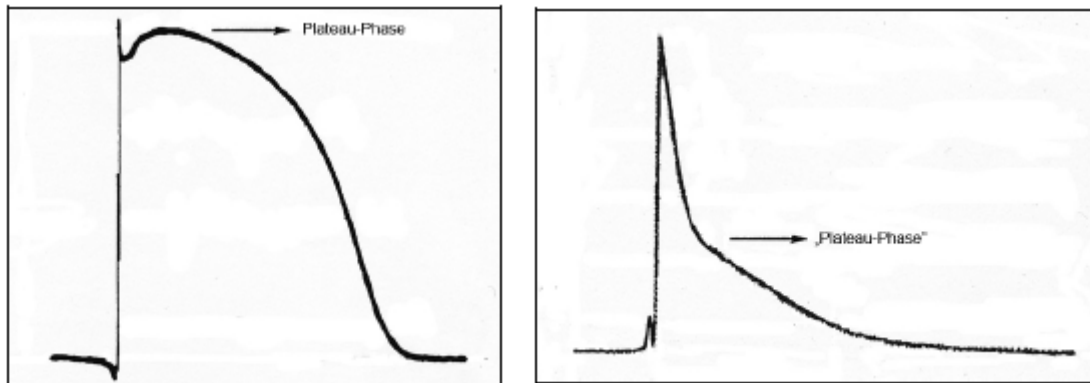


Abb. 2.6 Vergleichende Darstellung eines humanen MAP, links nach Franz (1999) und eines murinen MAP, rechts, nach Knollmann et al (2001)

2.3.2 Vorgehen

Zur Messung monophasischer Aktionspotentiale am isolierten Mäuseherzen wird eine „Isolated Heart for Small Rodents (ICH-SR, Size I)“-Apparatur der Firma Hugo Sachs Elektronik/Harvard Apparatus (D-79232 March-Hugstetten) eingesetzt, um das entnommene Organ retrograd via Kanülierung der Aorta zu perfundieren und auf Körpertemperatur zu halten.

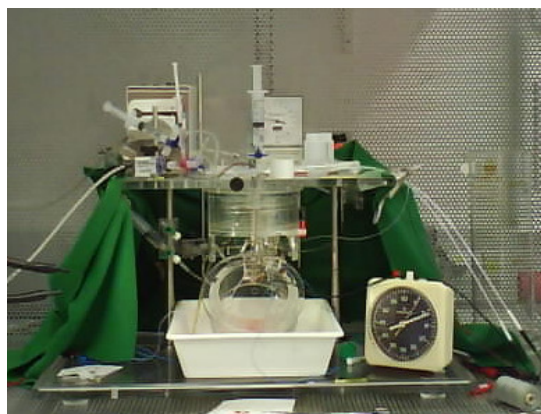


Abb. 2.7 Langendorff-Apparatur im Faradayschen Käfig

2.3.2.1 Vorbereitung

Das aus Plexiglas bestehende Gerät besitzt einen Flüssigkeitskreislauf zur Durchströmung mit $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ warmem destilliertem Wasser. Auf diese Weise wird die gesamte Einrichtung auf einer konstanten Temperatur betrieben. Zudem ist das Gerät mit einem pumpenbetriebenen Zulauf versehen, durch den der vortemperierte, mit Carbogen[®] versetzte Krebs-Henseleit-Puffer (Zusammensetzung siehe unten) dem Herzen zugeleitet werden kann. Die dafür vorgesehenen Leitungen durchlaufen dabei das bereits vorgewärmte Gerät, um eine optimale Temperaturangleichung zu ermöglichen. Um hinsichtlich der Vorlast physiologische Bedingungen schaffen zu können, ist über eine Starling-Membran eine stufenlose Regulierung des Drucks von 0 bis 150 mm Hg möglich. Dadurch kann sowohl bei konstantem Durchfluss als auch bei gleichbleibendem Druck gearbeitet oder von der einen zur anderen Betriebsweise gewechselt werden. Dabei ist der zu erreichende Druck einerseits als Qualitätskontrolle für die Dichtigkeit der Präparation zu werten, gleichzeitig auch ein Hinweis für die korrekte Positionierung des Herzens auf der Aortenkanüle (siehe unten, Kap. 2.3.2.2.). In unserem Versuch sollte der Druck möglichst konstant bei $90 \pm 15 \text{ mmHg}$ liegen, während der Durchfluss sich der Herzschlagfrequenz variabel anpassen konnte.

Die Langendorff-Apparatur sowie der frisch angesetzte Puffer sollten mindestens 30 Minuten vor Versuchsbeginn temperiert werden.

2.3.2.2 Herzpräparation

Um vergleichbare und der physiologischen Situation möglichst ähnliche Messwerte zu erzielen, ist die standardisierte und rasche Präparation des entnommenen Herzens unabdingbar.

Die Mäuse werden mittels Injektionsnarkose (Ketamin 50mg/kg KGW, Xylazin 20mg/kg KGW; intraperitoneale Applikation) unter Zusatz von Heparin (250 I.U. Heparin je Maus) betäubt und nach Erreichen des analgetischen Stadiums mittels zervikaler Dislokation getötet. Es erfolgt eine rasche Thorakotomie mit zwei Schnitten im jeweils lateralen Drittel des Rippenbogens, sodass nach Durchtrennung des Zwerchfells und Hochklappen des Brustbeins der gesamte Brustraum frei zugänglich ist. Das Herz kann so einschließlich der Lungenflügel und des Thymus zügig entnommen und in kalte Kochsalzlösung (phys. NaCl, $+4^{\circ}\text{C}$) überführt werden. Dies bewirkt nach wenigen Herzschlägen einen Stopp der mechanischen Herzaktivität, wodurch eine rasche Druckentlastung und eine schnelle Absenkung der Stoffwechselaktivität des nun nicht mehr sauerstoffversorgten Organs gewährleistet werden. Zudem wird die Feinpräparation in 20-facher Vergrößerung (Binocular) durch die Inaktivität des Herzens erleichtert und somit unabsichtlichen

Verletzungen entgegengewirkt. Zunächst werden sämtliche Lungenanteile und Luftröhrenreste entfernt, anschließend wird das Herz mit der „Vorderseite“ (Facies auricularis) zum Präparator liegend gelagert. Der Thymus wird nun angehoben und mittels eines schrägen Schnittes von rechts unten nach links oben über die Herzbasis abgesetzt. Durch diese Vorgehensweise werden sämtliche Gefäße freigelegt und in der Regel die Aorta bereits auf die benötigte Länge gekürzt, sodass sie nun kanüliert werden kann (siehe Abb. 2.8).

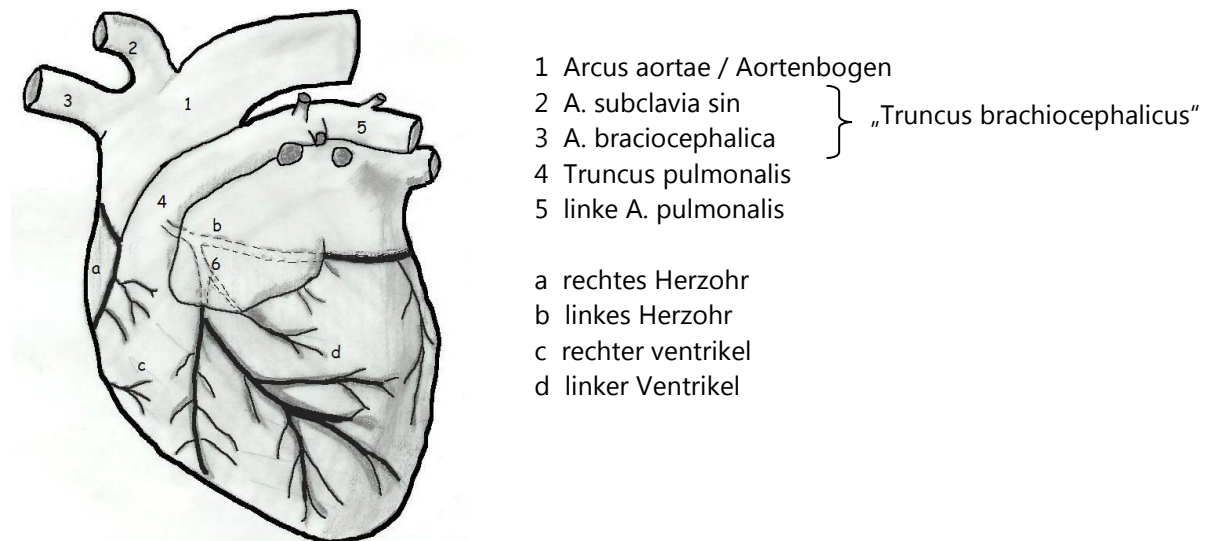


Abb. 2.8 Schematische Darstellung des Mäuseherzens, Facies auricularis (nach Nickel et al., 1992; Darstellung eines Hundeherzens, bearbeitet)

Bei optimaler Präparation ist der Aortenbogen bis über dem Truncus brachiocephalicus erhalten und kann nun auf eine vorbereitete Kanüle geschoben werden. Dabei ist darauf zu achten, dass die befestigende Ligatur genug Festigkeit aufweist, um das schlagende Herz zuverlässig zu fixieren und um die Dichtigkeit der Präparation zu gewährleisten. Das Kanülenende muss aus demselben Grund bis über den Abgang des Truncus brachiocephalicus reichen, darf aber nicht so weit vorgeschoben werden, dass die Koronararterien dadurch verschlossen sind oder gar die Aortenklappe mechanisch behindert wird, was einer ausreichenden Perfusion (erkennbar am zu hohen Perfusionsdruck) entgegensteht (siehe Abb. 2.9).

Um der Gefahr von Luftembolien vorzubeugen, sollte bei diesem Arbeitsschritt darauf geachtet werden, dass entweder unter konstantem Perfusionsfluss oder zumindest mit stehenden Flüssigkeitssäulen innerhalb der Aorta bzw. der Aortenkanüle gearbeitet wird, also dass das Montieren des Herzens unterhalb eines Flüssigkeitspegels erfolgt.

Der gesamte Vorgang vom Töten der Maus bis zur erfolgreichen Reperfusion in der Langendorff-Anlage sollte optimalerweise innerhalb von 3 bis maximal 5 Minuten abgeschlossen sein, um eine Wiederaufnahme der Herztätigkeit zu ermöglichen.

1 Aortenbogen mit vorgeschobener Aortenkanüle

2 A. subclavia sin

3 A. brachiocephalica

4 Truncus pulmonalis

5 linke A. pulmonalis

a rechtes Herzohr

b linkes Herzohr

c rechter ventrikel

d linker Ventrikel

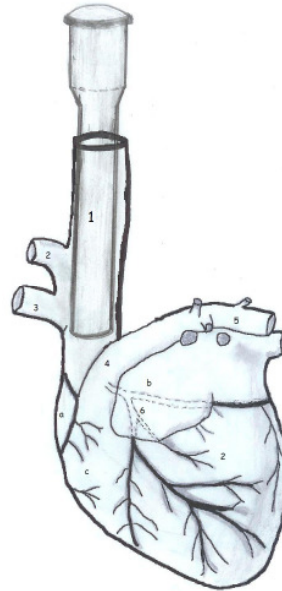
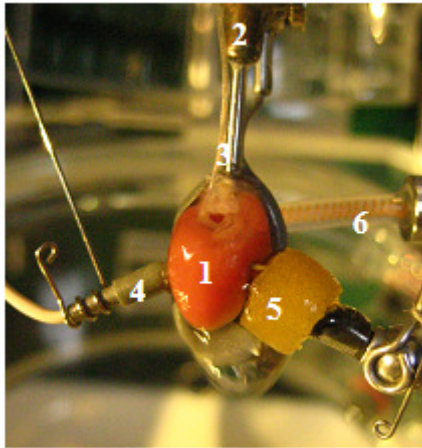


Abb. 2.9 Darstellung der korrekt positionierten Kanüle (nach Nickel et al, 1992, bearbeitet)

2.3.3 Ableitung Monophasischer Aktionspotentiale

Die Aktionspotentialdauer (APD) im Langendorff-Versuch ist deutlich frequenzabhängig (Fabritz et al., 2003), darum ist eine gleichbleibende Herzfrequenz während der Messung Grundvoraussetzung, um verschiedene Messungen miteinander vergleichen zu können. Um diese Bedingung für alle Versuche zu erreichen, werden die Herzen nach einer kurzen Equilibrierungszeit (5 Minuten) mittels eines elektrischen Katheters (NuMed Mouse Pacing Catheter bipolar Cat #MP001; NuMed Inc.; Hopkinton, NY 12965, USA) intracardial stimuliert. Dafür wird am bereits im Gerät montierten Herzen das rechte Herzohr so nah wie möglich am Gesamtorgan entfernt. Es entsteht eine sehr kleine Öffnung, die ausreicht, den Pacing-Katheter einzuführen und die ihn gleichermaßen stabilisiert und in Position hält. Die mit bipolaren Elektroden versehene Spitze des Katheters sollte im Bereich des AV-Knotens bzw. des interventrikulären Septum liegen. Die Impulsgebung erfolgt über die Stimulator-Ausgänge des PowerLab 800 ® (Firma ADInstruments) unter Abschirmung mittels UIISO ® (Universal Stimulated Output Unit, Firma Hugo Sachs), um Signalkontaminationen zu minimieren. Die Herzfrequenz lässt sich fließend in 0,01Hz-Schritten variieren, wobei wir neben unstimulierten (nativen) Signalen als Stimulationsstandards die Frequenzen 6, 8, 10, und 12 Hz festgelegt haben (entspricht 360, 480, 600, 720 bpm oder Zykluslängen von 166, 125, 100 und 83 ms).

Nach der Platzierung des Katheters wird das Herz mit Hilfe einer Halterung stabilisiert und es werden EMG-Elektroden angelegt. Weiterhin werden zur Aufzeichnung monophasischer Aktionspotentiale Spezialelektroden auf dem rechten und linken Ventrikel aufgelegt:



- 1 Mäuseherz in Halterung
- 2 Aortenkanüle
- 3 Pacing Katheter
- 4 MAP- Elektrode, Modell Hugo Sachs II
- 5 MAP-Elektrode, Modell Münster
- 6 EMG-Elektrode

Abb. 2.10 Ableitung von MAP in der Langendorff-Aparatur (zweite EMG-Elektrode nicht angelegt)

Die erfolgreiche Stimulation des Herzens („Capture“) lässt sich sowohl am zeitgleich abgeleiteten EMG als auch am zeitlich korrekt erfolgenden MAP erkennen. Neben den MAP vom rechten (1) und linken Ventrikel (2) wird zeitgleich das EMG (3) während der Stimulation der Stimulationsimpuls (4) und außerdem noch Flussrate (5) und Perfusionsdruck (6) erfasst:

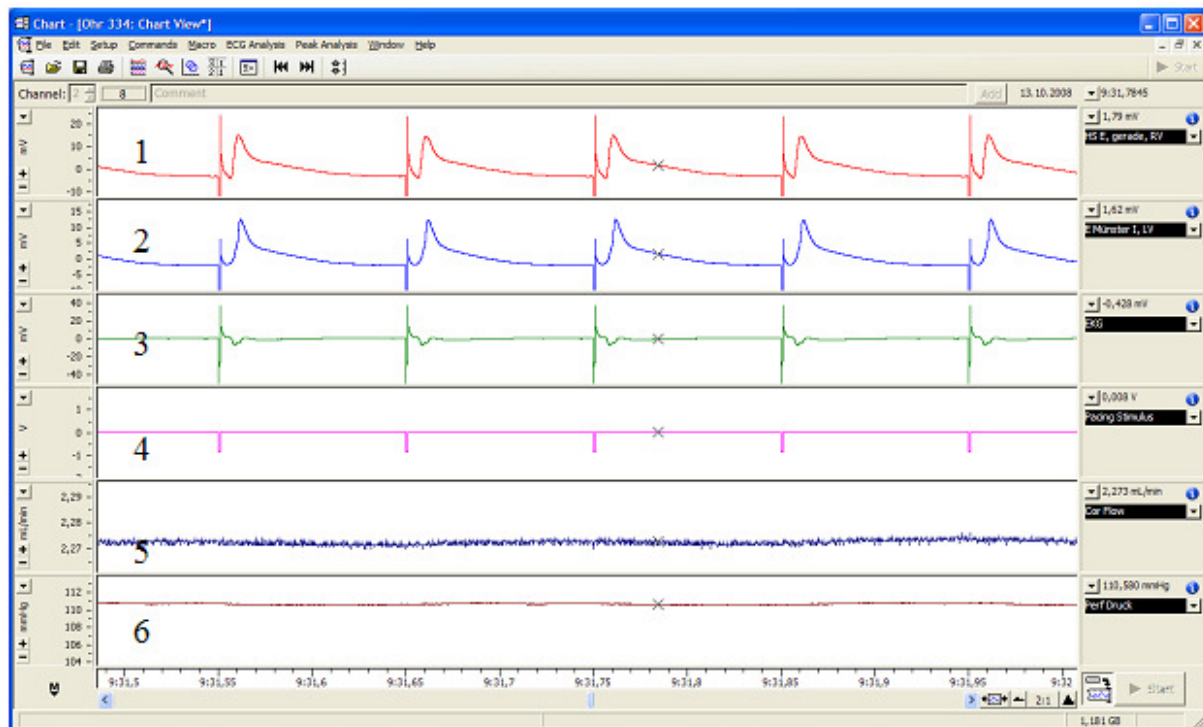


Abb. 2.11 Beispiel für MAP-Aufzeichnung mit PowerLab 800 und CHART

2.3.3.1 Qualitätskriterien für MAP

Monophasische Aktionspotentiale zeichnen sich durch ihre typische, teilweise speziesspezifische Morphologie aus. Bei der Maus sollten sie einen steilen, schnellen Aufstrich ($7,0 \pm 6,1 \text{ mV/ms}$) ohne vorhergehenden „undershoot“ aufweisen, der von einem raschen Abstrich bis etwa zur 50%igen Repolarisation gefolgt wird. Obwohl das murine Aktionspotential im Gegensatz zum caninen oder humanen kein Plateau aufweist, kann eine Schulter oder Flanke ausgeprägt sein, die den Übergang von schneller zu langsamer Repolarisation charakterisiert. Das Wiedererreichen der Nulllinie erfolgt langsam, asymptotisch und ohne schnelles Unterschreiten der Nulllinie (alle Angaben aus Knollmann et al. 2001 und persönliche Kommunikation). Die Amplitude ist von den verwendeten Aufzeichnungsgeräten und den darin angewandten Filtern abhängig. Für den Menschen werden Werte von 10mV als Mindestmaß angesehen (Franz et al 1999), während für die Maus auch deutlich kleinere MAP akzeptiert werden (Fabritz et al, 2003; Amplitude $> 1 \text{ mV}$ bei stabiler Baseline und typischer Morphologie ausreichend). Im hier verwendeten Messsystem lag die mittlere Amplitude bei $17,40 \pm 6,37 \text{ mV}$ und der niedrigste gültig klassifizierte Wert bei $7,96 \text{ mV}$.

Die von uns festgelegten Qualitätskriterien lauten also:

- Stabile Nulllinie und typische Morphologie
- Amplitude mindestens 5mV
- Rasche Depolarisation, Aufstrichdauer unter 5ms
- Rasche erste Repolarisationsphase ohne Ausprägung eines Plateaus
- Asymptotische Näherung an die Nulllinie ohne gravierende Unterschreitung derselben ($< 0,5 \text{ mV}$)
- Bei Aufzeichnung von stimulierten Signalen: stabile Capture

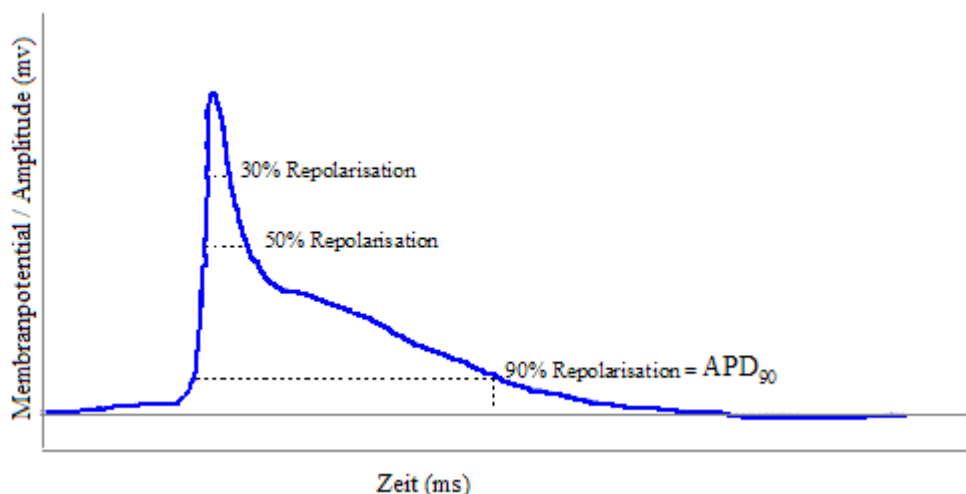


Abb. 2.12 Schematische Darstellung der MAP-Auswertung

2.3.3.2 Auswertung der Monophasischen Aktionspotentiale

Zur Akquisition und Auswertung der Signale wurden Geräte der Firmen Hugo Sachs und ADI (s.u.) und Software der Firma ADInstruments (CHART 5.5.4; LAB CHART .1.1 einschließlich der Extension „Peak Analysis“) genutzt. Für jede gewertete Frequenz wurden 17 konsekutive MAPs ausgewählt, die oben genannten Qualitätskriterien entsprechen, und es wurden Amplitude, Anstiegsgeschwindigkeit sowie die APD_{90} erfasst.

Lösungen, Geräte und Programme

1. Krebs-Henseleit-Puffer

13,56g NaCl	#S-9888; Sigma, St. Louis, MO, USA
0,69g KCl	#P-3911; Sigma (s.o.)
0,54g $MgSO_4 \times 7H_2O$	#M-1880; Sigma (s.o.)
0,32g KH_2PO_4	#P-5655; Sigma (s.o.)
4,18g $NaHCO_3$	Fluka-71627; Sigma Aldrich; CH-9471 Buchs
3,3g Glucose $\times H_2O$	Fluka-49159, (s.o.)
0,44g Pyruvat	#P-2256; Sigma (s.o.)
0,37g EDTA	#E-5391; Sigma (s.o.)
ad 2 Liter Aqua Millipore	
Puffer ca. 10 min. mit Carbogen begasen (bis pH 7,4), erst dann 0.74g $CaCl_2$ (#C-3881; Sigma, s.o.) dazugeben und mithilfe einer Vakuumpumpe filtern	

2. Physiologische Kochsalzlösung / 0,9% NaCl:

4,5g NaCl auf 500 ml Aqua Millipore

3. Ketamin	Ketamin 10%; medistar, D-53587 Ascheberg
4. Xylazin	Rompun 20mg/ml; Bayer Vital GmbH, D-51368 Leverkusen
5. Heparin	Heparin-Natrium 25000; ratiopharm, D-89070 Ulm

2.4 Echokardiographie

2.4.1 Grundlagen

Die Echokardiographie ist eine Untersuchung des Herzens mittels Schallwellen, die in einem Frequenzbereich von 1 bis 15 MHz liegen und vom menschlichen Gehör nicht mehr

wahrgenommen werden kann. Die technische Voraussetzung, zur Erzeugung von Ultraschallwellen, basiert auf piezoelektrischen Kristallen, die in den Schallköpfen verwendet werden und die elektrische in mechanische Energie umwandeln. Die erzeugten Ultraschallwellen unterliegen den aus Akustik und Optik bekannten Gesetzen der Absorption, Brechung, Reflexion, Streuung und Transmission, die man sich für die Untersuchung zunutze macht. Wenn Ultraschallwellen im Organismus auf unterschiedliche Gewebearten stoßen, werden diese nach den Gesetzen der Grenzzonenreflexion in Abhängigkeit der Schallleitfähigkeit des jeweiligen Gewebes absorbiert oder reflektiert. Der Ultraschallkopf dient dabei sowohl als Emitter der auslösenden Ultraschallwellen als auch als Empfänger der reflektierten Schallwellen, die dann über die (Rück-) Umwandlung in elektrische Energie als Lichtpunkte auf einem Monitor dargestellt werden können. Die Helligkeit der Lichtpunkte repräsentiert die Reflexionsintensität, während die Laufzeitermittlung die Signalentfernung vom Schallkopf auf der Longitudinalen markiert. Dieses sogenannte M-Mode-Verfahren (korrekt eigentlich TM-Mode für „time“ und „motion“) stellt Grenzflächensignale entlang des Messstrahles gegen die Zeit dar. Durch die Beschränkung auf einen Messstrahl sind sehr hohe Bildwiederholraten (frame rate) möglich und damit eine sehr genaue Darstellung schnell ablaufender, komplexer Bewegungsmuster, wie sie zum Beispiel an der Herzmuskelwand und den Herzklappen zu finden sind. Zusätzlich können bei den heute gebräuchlichen phased-array-Systemen auch Ultraschallemissionen in lateraler Ablenkung analysiert werden, sodass ein zweidimensionales Bild (2D-Bild) entsteht, in dem Strukturen in Längs- und Querrichtung dargestellt werden.

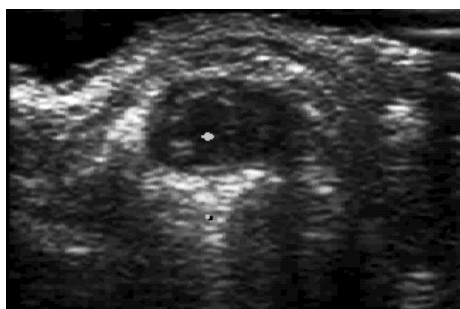


Abb. 2.13 Echokardiographie: parasternal kurze Achse im 2D-Bild

Während die Echokardiographie in der Humanmedizin schon lange ein Standardverfahren ist, war die Untersuchung von wesentlich kleineren Tieren wie der Maus an die Entwicklung von Schallköpfen gebunden, die auch kleinste Strukturen detailgenau darstellen. Eine zusätzliche Schwierigkeit liegt in der hohen Herzfrequenz der Tiere. Diese setzt eine sehr hohe frame rate voraus. Zur Analyse der linksventrikulären Masse bei Mäusen wurde von Manning et al. (1994) erstmals die Verwendung der Echokardiographie bei Mäusen

beschrieben. Zwei Jahre später wurde in einer umfangreicheren Studie (Tanaka et al. 1996) die Eignung des Ultraschalls für die Bestimmung von Herzmaßen in vivo an Mäusen unterschiedlichen Genotyps gezeigt. Die Methode erwies sich vor allem bei Veränderungen, die mit Hypertrophie einhergehen, als geeignetes Mittel, um zwischen gesunden und Tieren mit vergrößertem Herzen zu unterscheiden.

2.4.2 Durchführung

In Anlehnung an die Vorgehensweise in der Humanmedizin wurden in der vorliegenden Arbeit die Maße des linken Ventrikels im M-Mode bestimmt.

Um vergleichbare Messungen zu erhalten und Bewegungsartefakte zu vermeiden, werden die Tiere unter leichter Isofluran-Narkose untersucht (Einleitung 1,5 –2,0 Vol% Isofluran in 1,5l Sauerstoff oder Carbogen; Erhaltung mit 0,5Vol% Isofluran). Die Narkose wird so flach gehalten, dass die Mäuse gerade immobilisiert und in einem Hypnosestadium sind, erkennbar an der erhaltenen mittleren Pulsfrequenz von ~600 bpm. Das Fell wird geschoren und die Haut mit reichlich Ultraschallgel versehen, um eine luftblasenfreie Ankopplung des Schallkopfes zu ermöglichen. Die transthorakalen Echokardiographien werden mit einem 15-MHz-Schallkopf an einem Sonos 5500™ (Philips Medical Systems) durchgeführt, und von jedem Tier wird eine Übersicht im 2D-Mode angefertigt um strukturelle Fehlbildungen auszuschließen. Dabei dienen die Papillarmuskeln als Wegmarke, um die Schnittebene in Längs- und Querschnitt zu definieren. Abschließend werden mehrere (5-15) Aufnahmen im M-Mode gespeichert.

2.4.3 Auswertung

Die Auswertung erfolgt durch zwei Untersucher ohne Kenntnis der Gruppenzugehörigkeit der Tiere. Zunächst wird eine strukturelle Analyse im 2D-Bild durchgeführt, anschließend wird im M-Mode nach der von der American Society of Echocardiography definierten Methode im „edge-to-edge“ Verfahren der linke Ventrikel vermessen.

Je Tier werden fünf Messungen von verschiedenen Schlägen jeweils für einen Wert gemittelt.

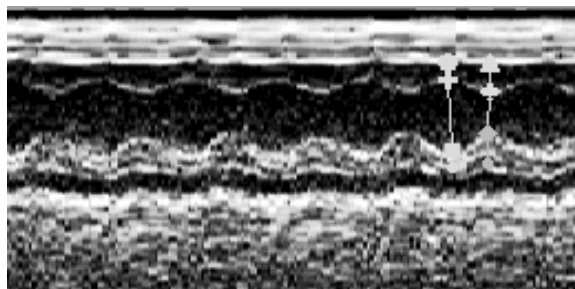


Abb. 2.13 M-Mode in der parasternal langen Achse: Darstellung der Messpunkte

Die erhobenen Parameter sind:

- Dicke des interventrikulären Septums, endsystolisch (IVSs)
- Durchmesser des linken Ventrikels, endsystolisch und enddiastolisch (LVIDs, LVIDd)
- Durchmesser der linksventrikulären Hinterwand, endsystolisch und enddiastolisch (LVPWs, LVPWd)

Aus den gemessenen Parametern wurde die Verkürzungsfraction (SF), die relative Wandstärke (RWT = Relative Wall Thickness) und die Masse des linken Ventrikels nach folgenden Formeln berechnet:

$$SF = (LVID_d - LVID_s) / LVID_d \quad (SF \text{ in } \% = SF * 100)$$

$$RWT = (IVS_d + LHW_d) / LVID_d$$

$$LV \text{ mass (mg)} = 1,055 * (IVS_d + LVID_d + HW_d)^3 - LVID_d^3$$

Die statistische Auswertung erfolgt mithilfe der Software Graph Pad Prism 4.

2.5 Anthropometrische Analysen

Bei kleinen Nagern wie Mäusen und Ratten unterliegt das Körpergewicht erheblichen Schwankungen, die Herzgewicht zu Körpergewicht-Ratio ändert sich nicht nur im Laufe des Alterungsprozesses, sondern unterliegt auch geschlechtsspezifischen Schwankungen (Tiemann et al. 2003).

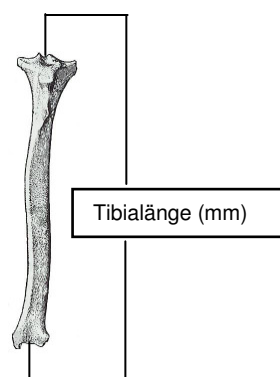


Abb. 2.14 Tibia eines Hundes (aus Nickel et al., 1992)

Auch der klinische Status beeinflusst das Körpergewicht und kann so bei Tieren mit herabgesetzter Vitalität oder veränderter Futteraufnahme und Wasseraufnahme zu veränderten Werten führen, während die Tibialänge bei Ratten und Mäusen ab dem 70. Lebensstag kaum mehr Veränderungen unterliegt (Tiemann et al. 2003; Yin et al. 1982). Die

Tibiallänge wird, nachdem der Knochen von Muskeln und anderen Gewebeteilen gereinigt worden ist, mit einer Präzisionsschiebelehre ermittelt. Die Länge wird von der Einziehung zwischen den Kondylen an der Proximalseite bis zur Einziehung der Cochlea an der distalen Seite gemessen.

Die zur Untersuchung verwendeten Herzen und Tibiae stammen von den Tieren, die bereits für die Aufzeichnung monophasischer Aktionspotentiale eingesetzt wurden. Die Herzen sind nach Abschluss der Langendorff Perfusion gewogen und eingefroren worden, die Tibiae direkt nach Tötung des Tieres. Bis zur Analyse sind die Organe zunächst in flüssigem Stickstoff (direkt nach Entnahme bis ca. 6 Stunden später) gelagert worden, anschließend bei -80°C im Tiefgefrierschrank.

2.6 Erstellung eines telemetrischen Elektrokardiogramms

Die Aufzeichnung und Auswertung eines Elektrokardiogramms gehört sowohl in der klinischen Diagnostik als auch in der kardiologischen Forschung zu den minimal nötigen Grundlagen, um die elektrophysiologische Situation des Herzens zu erfassen. Zudem ermöglichen Veränderungen des EKGs Rückschlüsse auf funktionelle Störungen. Dabei ist es wichtig zu berücksichtigen, dass nicht jede Veränderung jederzeit nachweisbar ist und insbesondere kleine Veränderungen oftmals nur unter definierten Bedingungen auftreten. Durch die Möglichkeit das EKG telemetrisch zu erfassen (ohne auf die Tiere zugreifen zu müssen) können alle im Alltag auftretenden Situationen in die Untersuchung mit einbezogen werden und die Erfassung über längere Perioden (24-Stunden-EKG) wird so erst repräsentativ für die tatsächlichen Anforderungen an das Herz.

2.6.1 Aufbau der Messeinheit

Die EKG-Aufzeichnung an der sich frei bewegenden Maus erfolgte durch die Anwendung einer Funkableitung (Firma Data Sciences International, DSI; New Brighton; MN 55112, USA). Dieses System besteht aus einem ca. 3,0 bis 3,5g schweren Implantat, das die vom Mausherzen erzeugten elektrischen Potentialänderungen mittels zweier Elektroden registriert. Anschließend werden die erhaltenen Signale in Radiofrequenzsignale konvertiert und an einen Empfänger (Receiver) gesendet. Letzterer ist an eine Schalt-Matrix angeschlossen, die das Signal digital filtert und an einen Computer leitet. Dort werden die Daten akquiriert, gespeichert und optisch dargestellt, sodass eine orientierende Überprüfung der Funktionsfähigkeit der Einheit gegeben ist. Außerdem ist auch eine oberflächliche

Auswertung der Daten bereits während der Aufzeichnung mit diesem System möglich. Zur exakten Auswertung wurden die Daten jedoch anschließend konvertiert und der Software PoNeMah (Vers. 4.60) bearbeitet.

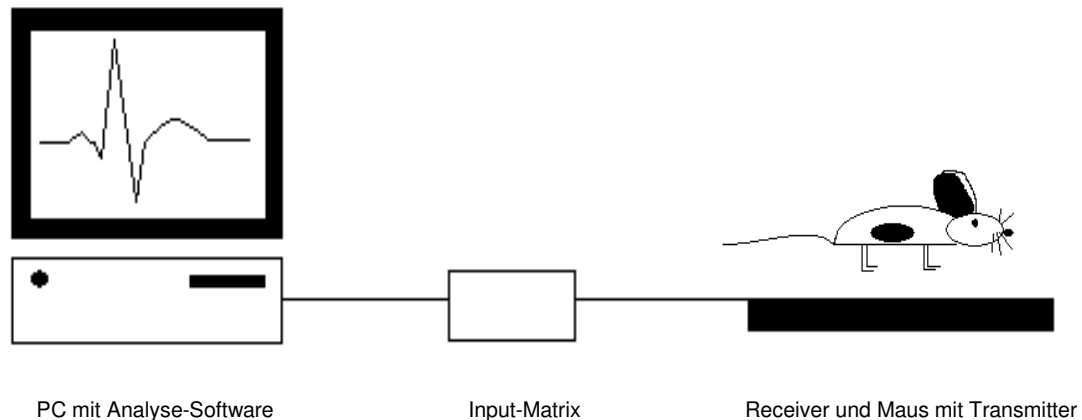


Abb. 2.15 Schematische Darstellung der EKG- Aufzeichnung

2.6.2 Operatives Vorgehen zur Transmitterimplantation

Es werden nur adulte Mäuse (mindestens 8 Wochen alt) mit einem Mindestgewicht von 22g mit einem Transmitter versehen.

Die Anästhesie für den chirurgischen Eingriff erfolgte durch intraperitoneale Mischinjektion von Ketamin (50mg/kg KGW) und Xylazin (20 mg/kg KGW). Nach standardisierter Vorbereitung (großzügiges Scheren des Haarkleides vom caudalen Abdomen bis zum Brusteingang, dreimaliges Desinfizieren mit PVP-Jodlösung), wird das Tier auf einer Plexiglasunterlage mit allen 4 Gliedmaßen fixiert und über eine Atemmaske eine zusätzliche leichte Anästhesie mit Isofluran durchgeführt (0,5-1,2 Vol.% in 3,0 l Sauerstoff, halboffenes System).

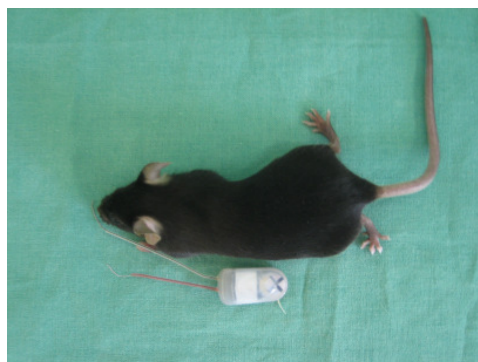


Abb. 2.16 Veranschaulichung der Implantat-Maus-Größenverhältnisse

Haut und Bauchhöhle werden in der Mittellinie auf einer Länge von ca. 2 cm eröffnet und der Transmitter mittig so im Bauchraum platziert, dass die Elektroden des Gerätes zum Kopf der Maus gerichtet sind. Besondere Vorsicht gilt dabei der Schonung von Leber und Blase sowie des Darmkonvoluts.

Zur Befestigung des Implantates werden die zum Betrachter zeigenden Schlaufen des Gerätes mit nicht resorbierbarem Nahtmaterial (Mersilene®; Ethicon; D-22851 Norderstedt) an der Bauchdecke befestigt. Anschließend wird eine der Elektroden (rot, zur Herzspitze gerichtet) mithilfe eines die Bauchwand penetrierenden Trokars aus der Bauchhöhle ausgefädelt. Die zweite Elektrode (weiß, zur rechten Schulter gerichtet) wird im vorderen Wundwinkel nach außen geführt. Die Bauchhöhle wird mit einer fortlaufenden Naht mit resorbierbaren Fäden (Vicryl®) vollständig verschlossen. Zum korrekten Platzieren der Elektroden wird die Haut stumpf mit einem Trokar oder einer feinen Klemme untertunnelt und im Bereich der Elektrodenspitze auf ca. 5 mm eröffnet. Durch diese Öffnung können die Elektroden durch Anheften mit nicht resorbierbarem Nahtmaterial an die Muskulatur dauerhaft fixiert werden. Der weitere Verschluss der Hautwunde erfolgt mit fortlaufenden Nähten (Abdomen: jeweils eine Reverdin-Naht für Bauchdecke und Haut; Elektrodenspitzen; Sultan'sche Diagonalhefte) mit resorbierbarem Faden. Die Operationszeit soll vom Setzen der Injektionsnarkose bis zum Hautverschluss nicht mehr als etwa 40 Minuten betragen. Im Anschluss wird den Tieren zum Ausgleich des Flüssigkeits- und des Energiehaushaltes noch 5%ige Glukose-Lösung (ca. 0,6ml/Maus) und physiologische Kochsalzlösung (ca. 0,4ml/Maus) in einer Mischspritze subkutan verabreicht. Außerdem wurde auch 5mg Carprofen pro kg KGW zur post-operativen Analgesie verabreicht. Die Maßnahmen werden nach jeweils 24 und 48 Stunden wiederholt. Die Tiere werden in der direkten postoperativen Phase (1 bis 2 Stunden) wahlweise mit Rotlicht oder Wärmflaschen versorgt, um ein Auskühlen zu verhindern. Es wird in den ersten vier bis sieben Tagen nach dem Eingriff Futter vom Käfigboden angeboten und die Trinkflaschen mit langen Tüllen versehen, um sie leichter erreichbar zu machen.

Die Ruhe-EKGs werden frühestens nach Abklingen der Einwirkung der Anästhetika 8 Tage postoperativ vorgenommen, die Belastungs-EKGs erst nach vollständigem Abheilen der Hautwunden nach mindestens 10 Tagen.

2.6.3 Erstellung des 24-Stunden-EKGs

Zur Ableitung des 24-Stunden-EKGs wird die Messeinheit im Tierraum platziert und je Maus eine Zeitspanne von ca. 24 Stunden aufgezeichnet. Zur Auswertung von Zeiten und

Strecken werden mit DSI-PoNeMah (Version 4.60) alle 12 Minuten jeweils 60 Sekunden analysiert und aus diesen Daten (für die Hell- und Dunkelzyklen getrennt) minimale, maximale und mittlere Herzfrequenzen ermittelt und in diesem Bereich insofern möglich jeweils 10 konsekutive Schläge ausgewertet. Für die maximalen Herzfrequenzen war dies aufgrund massiver Artefakte in der Regel nicht möglich. Aus diesem Grund und um eine frequenzunabhängige Vergleichsmöglichkeit zu erhalten, wurde bei allen Tieren dieselbe Auswertung auch bei einer Frequenz von 500 bpm durchgeführt. Dabei werden folgende Werte erfasst: Herzfrequenz (bpm), P-Dauer (ms), PR-Interval (ms), QR-Interval (ms), PQ-Interval (ms), Breite des ORS-Komplexes (ms) und QT-Zeit (ms). Aus der QT-Zeit wurde auch die korrigierte QT-Zeit nach Mitchell (Mitchell et al, 1998) nach folgender Formel berechnet:

$$QT_c = QT_0 / (RR_0 / 100)^{1/2}$$

$QT_c =$	Korrigierte QT-Zeit (ms)
$QT_0 =$	Gemessene QT-Zeit (ms)
$RR_0 =$	Zykluslänge des beurteilten Herzschlages

Hinsichtlich des Auftretens von Rhythmusstörungen wird der gesamte Datensatz durchgemustert und Auffälligkeiten notiert. Die Auswertung erfolgt durch zwei Untersucher in Unkenntnis des Genotyps.

2.6.4 Erstellung der Belastungs-EKGs

Um das Auftreten von Herzrhythmusstörungen unter definierten Belastungssituationen zu untersuchen, haben die Tiere ein Schwimm- und Laufbandprotokoll durchlaufen. Im direkten Anschluss an die Laufbelastung wurde zusätzlich eine pharmakologische Stimulation mit Epinephrin oder Dobutamin (siehe Kapitel 2.6.4.3.: Medikamentöse Stimulation) durchgeführt.

2.6.4.1 Schwimmen

Nach der Aufzeichnung einer 5-minütigen Ruhepause im Haltungskäfig werden die Mäuse 5 Minuten in einem mit 36 +/- 1 °C warmen Wasser gefüllten Typ II Makrolonkäfig schwimmen gelassen. Dabei ist darauf zu achten, dass die Wassertiefe ausreichend ist, um die Tiere zur körperlichen Anstrengung zu animieren, sie aber bei eventuellem Sinken noch die

Möglichkeit haben, sich mit den Hinterbeinen abzustößen und so mit der Nase an der Oberfläche zu bleiben. Außerdem werden bewegliche Schwimmhilfen (Styropor-Zylinder) angeboten, die eine geringe Stütze ohne dauerhafte Festhaltungsmöglichkeit bieten. Konnten die Mäuse längeres (>5 sek) oder rasch wiederkehrendes (drei Mal in 10 sek) Tauchen nicht vermeiden, werden die Tiere kurzzeitig durch Halten an der Schwanzspitze und Wiederherstellung einer waagerechten Schwimmposition unterstützt. Nach Ablauf der Schwimmzeit werden die Tiere mit einem Handtuch gut abgetrocknet, um die Putzintensität zu minimieren, da diese zu Bewegungsartefakten im EKG führt. Anschließend werden die Tiere wieder in den Käfig gesetzt. Dort wird noch über 15 Minuten die Nachbelastungszeit aufgezeichnet.



Abb. 2.17 Maus beim Schwimmversuch

2.6.4.2 Laufen

Die Belastung mittels Laufband erfolgt auf einer Simplex II Metabolic Modular Treadmill® der Firma Columbus Instruments®; OH 43204, USA) Es wird zunächst eine 5-minütige Ruhepause im Käfig aufgezeichnet, anschließend werden die Tiere auf das Laufband gesetzt und ihnen eine 3-minütige Adaptionperiode ermöglicht. Während dieser Zeit ist das elektrische Schock-Grid (Einstellungen: Repetition-Rate 8, Intensity: 8) am Ende des Laufbandes bereits aktiviert, um den Tieren dessen Funktion zu verdeutlichen. Nach Beendigung der Eingewöhnungszeit wird ein Rampenprotokoll gestartet, bei dem von einem Neigungswinkel von 0° und einer Geschwindigkeit von 1m/min alle 2 Minuten die Geschwindigkeit um 1,15m/min und alle 4 Minuten der Neigungswinkel um 5° erhöht wird. Maximal können 25° Neigung und 15,95m/min an Geschwindigkeit erreicht werden. Die Tiere werden belastet, bis sie häufigen (> 5 Kontakte in 15 sek.) oder dauerhaften (> 5 sek.) Kontakt mit dem Shock-Grid nicht mehr vermeiden können, was in diesem Versuch als das Erreichen der Leistungsgrenze interpretiert wird.

2.6.4.3 Medikamentöse Stimulation

In unmittelbaren Anschluss an die Laufbandbelastung wird den Mäusen Dobutamin verabreicht (Dobutamin Solvay® 500mg/50ml; Solvay Pharmaceuticals, D-30173 Hannover; 1,5 µg/g Maus i.p.) (Wiesmann et al., 2001); nach weiteren 10 Minuten wird Epinephrin (Suprarenin®; 2 mg / kg i.p.; Sanofi Aventis, D-65926 Frankfurt am Main) (Mohler et al., 2003) appliziert und das EKG noch über mindestens weitere 15 Minuten aufgezeichnet.

2.6.5 Auswertung

Die Auswertung der Belastungs-EKGs erfasst minimale, mittlere und maximale Herzfrequenz jeweils vor, während und nach der Belastung und die Analyse eventuell auftretender Herzrhythmusstörungen während der Belastungsphasen.

Die Auswertung der unter medikamentöser Stimulation aufgezeichneten EKGs beinhaltet ebenfalls minimale, mittlere und maximal aufgetretene Herzfrequenz sowie die Analyse möglicherweise auftretender Rhythmusstörungen.

Auch hier wurde die Auswertung von zwei Untersuchern vorgenommen, die hinsichtlich des Genotyps geblindet waren.

Geräte und Programme:

1. Akquisition:

- DSI DataQuest A.R.T. Silver Ver. 4.0, eingebaut in einem handelsüblichen Computer mit Betriebssystem Windows XP
- EKG-Transmitter, Model TA10EA-F20; Data Sciences International
- Receiver RPC-1, Data Sciences International

2. Auswertung:

- DSI P3 Raw Convert, Vers. 1.0 Data Sciences International
- DSI PoNeMah, EKG-Auswertesoftware; Vers. 4.60

2.7 Aufzeichnung von Oberflächen-EKGs

Die Erstellung des 3-Kanal-Oberflächen-EKGs erfolgt nicht-invasiv in Form eines Kontakt-EKGs. Die Tiere werden narkotisiert, um eine möglichst artefaktarme Aufzeichnung zu

gewährleisten. Zu diesem Zweck wird entweder Isofluran verwendet (2,5 Vol% in reinem Sauerstoff oder Carbogen zur Einleitung, max. 1,5 Vol% zur Erhaltung) oder den Tieren wird intraperitoneal Ketamin (50 mg/kg) und Xylazin (20 mg/kg) per Mischspritze injiziert. Anschließend werden die Tiere in Brust-Bauchlage auf eine mit modifizierten Kontaktelektroden (Ambu® Blue Sensor NF; Fef NF-50-A/12, Lot 1041327) versehene Styroporplatte gelegt und mit den Pfoten mittels leicht wieder ablösbarem Klebeband auf den EKG-Elektroden fixiert. Zwischen Elektroden und Pfoten wird Kontaktgel angebracht und anschließend das EKG aufgezeichnet (je 3 Minuten/Ableitung).

Zur EKG-Aufzeichnung kamen weiterhin folgende Geräte zum Einsatz:

- PowerLab 8/30, Firma ADInstruments
- Animal Bio Amp, Model ML 136, Firma ADInstruments und ein
- handelsübliches Laptop mit LabChart Ver. 6.1.1 for Windows einschließlich des Moduls „ECG-Extension“.

Die EKGs wurden ohne Filter mit einer Rate von 1k/s aufgezeichnet und anschließend mittels der bereits genannten Software ausgewertet.

Zur Auswertung wurde nur die qualitativ beste und markanteste (Ableitung Abl. II) verwendet und für jedes Tier über 70 konsekutive Herzschläge folgende Parameter ermittelt:

- RR Intervall (ms) / Herzfrequenz (bpm)
- PR Intervall (ms)
- P Dauer (ms)
- QRS Intervall (ms)
- QT Zeit (ms)
- QTcZeit (ms) – nach Mitchell korrigierte QT Zeit (Formel: siehe oben)

2.8 Berechnung der „Heart Rate Variability“

2.8.1 Grundlagen

Damit das sehr komplexe Säugerherz koordiniert seinen Arbeitsrhythmus einhalten kann, verfügt es im Gegensatz zu anderen Organen über eine selbständige automatische Steuerung der Arbeitsmuskulatur. Um es auch den Bedürfnissen des Gesamtorganismus anzupassen, ist diese Autonomie an das parasympathische und sympathische System gekoppelt, die maßgeblich für Frequenzänderungen verantwortlich sind. Die Bedeutung, die dem autonomen Nervensystem im Zusammenhang mit der Feinsteuerung des Herzens

(Herz-Frequenz-Variabilität, HRV) zukommt, ist erst in den letzten 20 Jahren erkannt und seitdem erforscht worden (TASK Force of The European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology, Heart rate variability, 1996). Eine wichtige Erkenntnis ist, dass bereits winzige Änderungen im Sinusrhythmus, die sich ggf. nicht in Frequenzänderungen niederschlagen müssen, Indikatoren für die Befindlichkeit des Organs darstellen. Ein in dieser Hinsicht inzwischen gut erforschter Wert ist die Herz-Frequenz-Variabilität, Heart rate variability. Der Begriff wird in der Literatur synonym für Veränderungen der augenblicklichen Herzfrequenz und die Oszillation aufeinanderfolgender Herzschläge verwendet. In dieser Arbeit meint HRV die Variabilität konsekutiver RR-Abstände.

Beim Menschen gilt eine herabgesetzte HRV als Indikator für ein höheres Risiko ein kongestives Herzversagen zu entwickeln oder einen spontanen Herztod zu erleiden. Bei vorbelasteten Patienten, zum Beispiel nach Myokardinfarkt, gilt eine niedrige HRV als Risikomarker für eine erhöhte Mortalität (Thireau et al., 2007).

Die Analyse kann mathematisch mittels deskriptiver statistischer Methoden erfolgen (= time domain analysis). Dabei sind Schwankungen im Sinusrhythmus oder Artefakte zweitrangig, dafür ist diese Methode ungenauer als die technisch aufwändigere Spektralanalyse (= frequency domain analysis), die zeitlich aufeinanderfolgende Abläufe nach Häufigkeit in verschiedenen Frequenzspektren und Amplituden darstellt.

Die Erforschung und Untersuchung der HRV ist erst mit der Verfügbarkeit digitaler Langzeit-EKGs und Rechnersystemen mit entsprechender Leistung und Speicherkapazität allgemein verfügbar geworden. Zwar ist die grundsätzliche Berechnung der HRV einfach, sie erfordert aber akkurate R-Zacken-Erkennung und ist aufgrund der teilweise immensen Anzahl ausgewerteter Herzschläge an die Verwendung automatisierter Prozesse gebunden.

2.8.2 Vorgehen

Bearbeitung der Datensätze zur Auswertung der Heart Rate Variability

Die bereits mit PoNeMah® ausgewerteten 24-Stunden-EKGs werden zunächst in Tag- und Nachtzyklus geteilt und die jeweiligen Rohdaten (die Abtastrate beträgt 1k/s) als ASCII-Datei gespeichert. Die Halbierung der Datensätze ist aufgrund der großen Anzahl von Herzschlägen pro Tag sinnvoll, da sonst schnell die Grenzen der Rechnerkapazität erreicht werden. Zudem ist sie für die Analyse der frequency domain ohnehin notwendig. Anschließend erfolgt die Weiterverarbeitung mit Cygwin® (Vers. 1.5.25-15), bei der alle

Zusatz-Informationen aus dem Datensatz bereinigt wurden und nur noch die Roh-Messwerte in chronologischer Reihenfolge übrig blieben. Außerdem erfolgte die Umwandlung von einer ASCII-Datei in eine Chart lesbare Text-Datei (*.txt), die dann von letztgenanntem Programm wie Rohdaten eingelesen werden kann. Die einmal eingelesene Datei kann dann im CHART-typischen Format gespeichert (*.adicht) und für beliebige Chart-Analysen genutzt werden.

Auswertung

Zur Auswertung der time domain wurde zunächst ein 12-Stundenzyklus zusammenhängend analysiert, wobei jeweils die Tagphasen und Nachtphasen miteinander verglichen wurden. Es wurden folgende Parameter erfasst:

Mean NN:	mittleres R-R-Intervall, entspricht normalem R-R-Intervall (in ms)
Median NN:	Median der R-R-Intervalle (in ms)
SDNN:	Standardabweichung aller Normalen R-R-Intervalle (in ms) als Marker für die gesamte autonome Variabilität
SD of Delta NN:	Varianz aufeinanderfolgender Normalintervalle (in ms) als Indikator von kurzzeitigen Schwankungen der Herzfrequenz
NN6:	Prozentsatz normaler konsekutiver R-R-Intervalle, die sich um 6 ms unterscheiden (in %), als Anzeiger der parasympathischen Herzaktivität. Dieser Wert leitet sich aus dem für Menschen definierten NN50 ab, dort entsprechen 50ms etwa 10% der normalen R-R-Intervallen (vgl. Thiureau et al., 2007)

Aus den eigenen Untersuchungen (24-Stunden-EKGs, Belastungs-EKGs) sind die physiologischen Grenzen der Herzfrequenzen gut ableitbar, sodass folgende Werte zugrunde gelegt werden konnten:

Interval classification

Artifact	Ectopic	Normal	Ectopic	Artifact
57	< 70	< 214	< 300	ms

☒ Exclude ectopics from analysis

Abb. 2.18 in Chart festgelegte Grenzen zur HRV-Analyse (time domain)

Damit werden Herzfrequenzen im Intervall zwischen 857 und 280 bpm als gültig klassifiziert, während alles über 1052 bpm oder unter 280 bpm als Artefakt und von 1052 bis 857 bpm,

sowie von 280 bis 200 bpm als ektope Schläge gelten. Artefakte und ektope Schläge werden von der Berechnung ausgeschlossen, und wenn dadurch Lücken im Datensatz entstehen, werden diese durch interpolierte Schläge (das Normalintervall) ersetzt.

Um die durch das Einsetzen interpolierter Schläge entstandene Unschärfe des Datensatzes zu kompensieren und um eine bessere Vergleichbarkeit zu erzielen, wurden zusätzlich auch die kürzeren, manuell korrigierten Daten, die zur Auswertung der Frequency domain eingesetzt wurden (siehe unten), untersucht.

Die Analyse der frequency domain erfordert ein möglichst artefaktfreies, stabiles und stationäres Signal. Die Arbeit von Thierau et al., 2008 stellt einen Algorithmus vor, mit dem murine EKGs gemäß den Empfehlungen der Task Force of European Society of Cardiology (1996) analysiert werden können. Unter anderem zeigt Thierau, dass die Analyse mehrerer kurzer Segmente für die HRV-Frequency Domain Analyse empfehlenswert ist. Um von Aktivität und äußeren Gegebenheiten möglichst unbeeinflusste Ergebnisse zu erhalten, wird die Untersuchung bei den nachtaktiven Mäusen in deren Ruhephase, dem Tagzyklus, durchgeführt. Der gesamte Datensatz wird analysiert und ca. alle 2 Stunden ein 3 Minuten langes, durch Sinusrhythmus gekennzeichnetes Stück, welches keine großen Frequenzsprünge zeigt und das frei von Artefakten ist, analysiert. Es ergibt sich so im Mittel insgesamt eine EKG-Aufzeichnung von 18 Minuten, in dem die korrekte R-Zackenerkennung essentiell ist, weswegen der Datensatz bei Bedarf noch manuell bearbeitet wird, um dies sicherzustellen. Anschließend erfolgt die Analyse, bei der folgende Parameter mit den entsprechenden Frequenzbändern erfasst werden:

Total power (in ms^2)

Very Low Frequency (VLF, in ms^2); 0-0,15 Hz

Low Frequency (LF, in ms^2 ; 0,15 – 1,5 Hz) als Maß für die sympathische Aktivität

High Frequency (HF, in ms^2 ; 1,5 – 5 Hz) als Maß für den Parasympathikotonus

LF/HF-Ratio

2.9 Analyse von Ischämie- und Reperfusionseignissen

Die Überprüfung der Funktion von TASK-1 in pathologischen Zusammenhängen wurde im Rahmen von Ischämie-/Reperfusionseignissen untersucht. Die ersten auftretenden Veränderungen in ischämischen Geweben sind Sauerstoffunterversorgung und pH Wert-Senkung, beides Konditionen, die die Aktivität des TASK-1-Kanals modulieren (siehe Kapitel

1.1.3: Duprat et al., 1997; Trapp et al., 2008). Während der Ischämie steigt auch die Konzentration von PAF, das laut Barbuti et al., 2002 ebenfalls zu einer Aktivierung von TASK-1 führt. Neuere Studien zeigen, dass sich TASK-1 bei künstlich herbeigeführten Schlaganfällen bei Mäusen (durch 30-minütigen Verschluss der cerebralen Hauptschlagader) neuroprotektiv auswirken kann (Meuth et al., 2009). Aus diesem Grund stellt sich die Frage, ob TASK-1-Defizienz bei Mäusen die Größe von Myokardinfarkten beeinflusst und ob im Rahmen ischämischer Prozesse am Herzmuskel die Inzidenz von Herzrhythmusstörungen bei veränderten Tieren anders ist als bei TASK-1 (+/+)-Mäusen.

2.9.1 Durchführung

In einer ersten Operation wird dem Tier der Transmitter zur telemetrischen Ableitung des EKGs implantiert. Anschließend wird durch transiente Ligatur der LAD die myokardiale Ischämie induziert. Kurz vor Beendigung der Reperfusionszeit (ca. 6 Stunden später) wird die Maus anästhesiert und das Herz entnommen, um Infarktgröße, Expressionsänderungen der K2P-Kanäle, Proteinexpression und Veränderungen in der zellularen Lokalisation zu erfassen.

Die Narkose wird mit Pentobarbital (90mg/kg als intraperitoneale Injektion) eingeleitet. Bereits jetzt erfolgt die subkutane Applikation des Analgetikums [Buprenorphin (0,05 – 0,1 mg/kg); Buprenovet®; Bayer Vital GmbH, D-51368 Leverkusen], um sicherzustellen, dass bei Ausleitung der Narkose eine ausreichende Analgesie gewährleistet ist und so Belastungen in der frühen postoperativen Phase effizienter gemildert werden. Eine ausreichende Narkosetiefe wird durch das Verschwinden des „hind limb withdrawal“-Reflexes überprüft. Hiernach werden die Tiere zunächst orotracheal intubiert und maschinell beatmet. Die Mäuse werden auf einer Heizmatte gelagert, Augen und Zunge werden feucht gehalten und das Operationsgebiet (Thorax) desinfiziert. Die Körpertemperatur wird mittel rektaler Sonde gemessen und bei 36 – 32°C konstant gehalten. Die Implantation des Transmitters (Modell TA10AE-F20, Fa. Data Sciences International) erfolgt subkutan im Bereich der gut verschiebbaren Hautpartie des Nackens des Tieres. Die zwei Elektroden werden durch einen subkutanen Tunnel nach vorne geführt und eine im Bereich der rechten Schulter, die andere im Bereich der Herzspitze an der Brustmuskulatur mit einer Naht fixiert. Nach Abschluss der Hautnaht im Nackenbereich wird sofort mit der Aufzeichnung des EKGs begonnen. Anschließend wird linksseitig im vierten Interkostalraum thorakotomiert, perikardiotomiert und das Herz freigelegt. Die linke Herzkranzarterie wird identifiziert und mit einer Fadenschleife ligiert.

Die erfolgreiche Ischämie kann visuell (Herzoberfläche wird blass) und über die typischen EKG-Veränderungen (sofortiger R-Zackenverlust, ST-Steckenhebung) sichergestellt werden. Die Tiere werden einer 40-minütigen Ischämie und anschließend durch Öffnen der Fadenschlaufe einer 6-stündigen Reperfusion unterzogen



Abb. 2.19 Freilegung der LAD

Nach Abschluss der Ischämie-Periode wird der Thorax schichtweise verschlossen und intrathorakale Luft durch Aspiration entfernt. Den Tieren wird 1 ml Kochsalz intraperitoneal verabreicht, um den Flüssigkeitsverlust während der OP auszugleichen. Bei Erwachen werden die Tiere extubiert, und es wird über einen vor der Maus platzierten Trichter Sauerstoff zugeführt, bis sich das Tier eigenständig davon entfernt. Dies wird auf einer Wärmeplatte unter Temperaturkontrolle durchgeführt, um die Tiere vor dem Auskühlen zu schützen. Im weiteren postoperativen Verlauf werden die Tiere permanent überwacht. Die sich einstellende Aktivität, eventuelle Futter- oder Wasseraufnahme sowie die Haarstellung werden als klinische Parameter herangezogen, um eventuelle Schmerzen zu diagnostizieren. Zusätzlich liefert das permanent aufgezeichnete EKG-Hinweise auf belastende Herzrhythmusstörungen.

Nach 6 Stunden Reperfusionszeit wird oben genannte Narkose erneut angewandt und erneut das Herz freigelegt, die noch vorhandene Fadenschlaufe wird geschlossen und den Tieren wird über die Vena cava maximal Blut entzogen. Sobald Schnappatmung und Kreislaufversagen einsetzen, kann terminal Evans Blue (1%ig; #E2129-10G; Sigma Aldrich, s.o.) zur Färbung der normal perfundierten Herzanteile in das Herz (rechte Kammer) injiziert und das Herz anschließend entnommen werden.

Überschüssiger Farbstoff wird mit Wasser ausgespült, das Herz von eventuell anhaftendem Fremdgewebe gereinigt und anschließend in 5 bis 6 circa 1mm dicke Scheiben geschnitten. Diese werden zur planimetrischen Untersuchung von beiden Seiten fotografiert und anschließend 25 Minuten bei Körpertemperatur ($37 \pm 1^\circ\text{C}$) mit 5%igem NBT (Nitro Blue

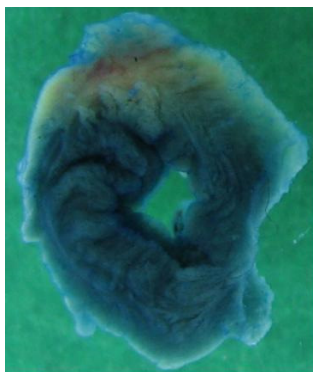
Tetrazolium; #N5514-10TAB; Sigma Aldrich, s.o.) inkubiert. Der Vitalfarbstoff wird von intakten Herzmuskelzellen aufgenommen und färbt diese lila, sodass eine Unterscheidung der ischämischen Herzgebiete (Area at risk, AAR) und der tatsächlich geschädigten Bereiche (Infarct area, IA) möglich ist. Dafür werden die Herzschnitte nach der Inkubation mit NBT erneut von beiden Seiten fotografiert und diese Bilder ebenfalls planimetrisch ausgewertet. Das vor der Herzentnahme entnommene heparinisierte Blut wird abzentrifugiert und das Plasma gewonnen. Es steht direkt für klinisch-chemische Untersuchungen zur Verfügung oder kann zur späteren Verwendung bei -20°C eingefroren werden.

2.9.2 Auswertung

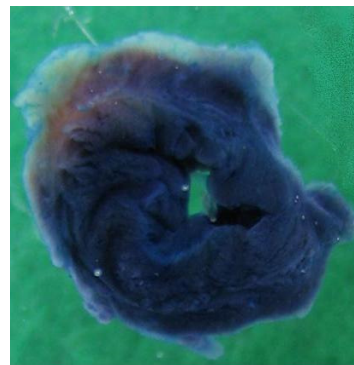
2.9.2.1 Planimetrie

Die angefertigten Fotografien der Herzschnitte werden mit dem Programm SigmaScan Pro Image Analysis (Vers. 5.0.0) planimetrisch ausgewertet.

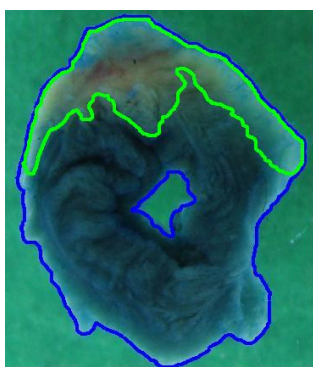
Dabei wird jeder einzelne Schnitt (immer Vor- und Rückseite) zunächst für beide Färbungen in seiner Gesamtfläche erfasst (Messung erfolgt in Pixel).



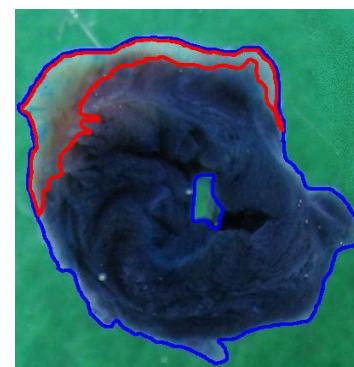
mit Evans Blue gefärbter Herzschnitt



derselbe nach Inkubation in NBT



Bestimmung der Gesamtfläche (blau) und der Area at risk (grün)



Bestimmung der Gesamtfläche (blau) und der Infarct area (rot)

Abb. 2.20 Beispiel für eine planimetrische Auswertung

Da die zweite Färbung mit NBT eventuell dem Gewebe Flüssigkeit entzieht und es dadurch schrumpft, genügt es nicht, die Gesamtfläche nur einmal zu messen. Anschließend kann im Evans Blau gefärbten Schnitt die ungefärbte Fläche, also der ischämische Bereich (AAR, Area at risk) markiert und gemessen werden.

Der prozentuale Anteil der AAR an der Gesamtfläche ist ein Marker für die Konstanz, mit der die Operation durchgeführt worden ist. Wünschenswert ist eine möglichst geringe Schwankung um den Eingriff als standardisiert klassifizieren zu können. Im NBT gefärbten Schnitt kann die eigentliche Infarktfläche (IA; infarct area) gemessen werden. Diese fällt in der Regel geringer aus, als die AAR, da in den Randbezirken des von der Hauptblutzufuhr abgeschnittenen Gebietes die Muskelzellen den Farbstoff noch über Diffusionsvorgänge aufnehmen. Die für alle Schnitte gemessenen Flächen werden addiert (Gesamtfläche/Area at risk/Infarkt area) und die absoluten Werte (Pixel) in prozentuale Werte relativiert.

Um Schwankungen in der Organgröße auszugleichen, wird die AAR als prozentualer Anteil an der Gesamtfläche berechnet. Da die Infarktgröße immer direkt von der Größe der AAR abhängig ist, wird sie als % der AAR angegeben.

2.9.2.2 Elektrokardiogramm

Das während des gesamten Versuches zeitgleich abgeleitete EKG dient zur Überprüfung der einsetzenden Ischämie (siehe oben). Darüber hinaus wird es in seiner Gesamtheit auf das Auftreten von Rhythmusstörungen vor, während und nach der Ischämiezeit beurteilt. Der Zeitraum vor Thorakotomie wird auch zur Evaluation von Zeiten und Strecken -analog dem bereits beschriebenen Verfahren für die Oberflächen-EKG- genutzt (siehe Kapitel 2.6.5), um die Auswirkungen der verschiedenen Narkosemittel vergleichend und in Relation zur wachen Maus untersuchen zu können (Werte aus den 24Stunden-EKGs, Oberflächen-EKGs unter Isofluran oder Ketamin-Xylazin-Narkose und Werte aus diesem Versuch unter Pentobarbital/Buprenophin).

Alle Auswertungen werden von zwei unabhängigen Untersuchern in Unkenntnis des Genotyps vorgenommen.

Die statistische Auswertung erfolgt mit Graph Pad Prism. (Version 4.03).

3. Ergebnisse

3.1 Tiere

3.1.1 Zuchtbuchauswertung

Bei transgenen Mäusen wird häufig eine geringere Lebenskompetenz beobachtet, die sich in geringerer Lebenserwartung, höherer Jugendsterblichkeit und verringerter Geburtenrate niederschlägt. Zum Teil ist die vorgenommene Modifikation der Tiere dafür verantwortlich (zum Beispiel Krebsmodelle, Mäuse mit organischen Defiziten), aber auch Tiere, die phänotypisch keine signifikanten Unterschiede aufweisen, sind häufig betroffen. Daher kann die Untersuchung von Lebenszeit und Fruchtbarkeit einen Hinweis auf die Relevanz der Mutation für den Gesamtorganismus bzw. den Mäusestamm geben.

Anhand des Zuchtbuches ist es möglich, die Lebenserwartung der TASK-1 (-/-) Mäuse im Vergleich zu den heterozygoten und TASK-1 (+/+)-Geschwistern zu betrachten. Tiere, die zur Zucht eingesetzt wurden oder nicht im Versuch eingesetzt, aber zur späteren Verwendung erhalten wurden, haben zum Teil ein hohes Alter erreicht und sind eines natürlichen Todes gestorben. Da Verpaarungen unter allen Genotypen durchgeführt worden sind, ist es ebenfalls möglich, die Fertilität der unterschiedlichen Genotypen anhand der Wurfgröße zu vergleichen. Der Beobachtungszeitraum für diese Parameter begann mit der eigenen Zucht im Dezember 2006 und endete für diese Arbeit im Februar 2009 bei 538 genotypisierten Tieren. Für diese Auswertung wurden nur Tiere berücksichtigt, die eines natürlichen Todes verstorben sind und keine offensichtlichen Hinweise auf das Vorliegen einer Grunderkrankung aufwiesen. Zum Beispiel wurde ein Tier (TASK-1 (+/+)), das aufgrund einer Zahnfehlstellung (Malocclusion) und Mangelernährung verstorben ist, nicht berücksichtigt.

Die Verteilung nach Genotypen war folgendermaßen:

Genotyp	Anzahl	davon verstorben	entspr. %	Lebenstage im Mittel +/- SD		
WT	183	4	2,19	210	±	99
TASK-1 (-/-)	134	12	8,96	123	±	97
Het	179	6	3,35	165	±	71
nicht genotyp.	41	/	/			
insgesamt	538	22	4,09			

Tab.3.1 Darstellung der mittleren Lebenserwartung je Genotyp

Aus der Übersicht ist zu ersehen, dass die Wildtyp-Mäuse sowohl die geringste Sterberate, als auch die längste Lebenserwartung haben, auch wenn hinsichtlich der Lebensstage in allen drei Gruppen große Schwankungen nachzuweisen sind.

Die statistische Auswertung erfolgte mit Microsoft® Excel 2000 (Ver. 9.0.2812) (Tabelle) und Graph Pad Prism (Kurve).

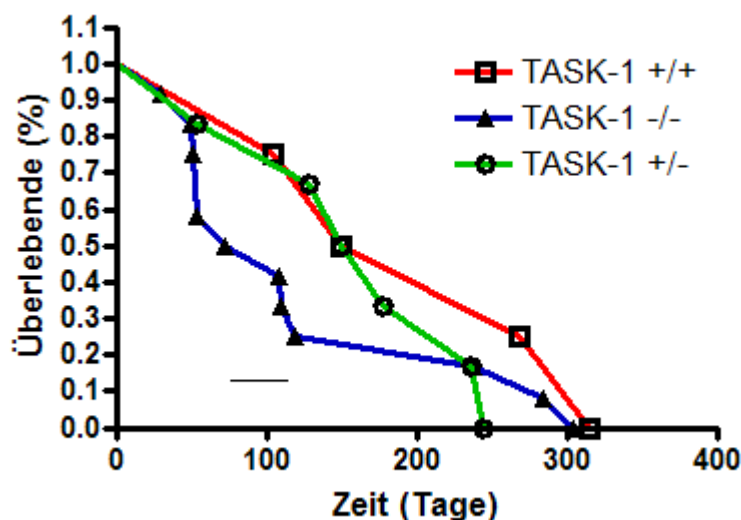


Abb. 3.1. Mortalität nach Genotyp; Kaplan-Meier-Kurve

Die Wurfstärke als Maß für die Fertilität wird als mittlere Anzahl Welpen für alle Würfe eines Mäusepaares ermittelt. Die Anzahl der Würfe innerhalb eines bestimmten Zeitraumes oder je Paar konnte nicht berücksichtigt werden, da die Paare aus logistischen Gründen nicht alle zur selben Zeit zusammengesetzt und darüber hinaus auch unterschiedlich lange zusammen belassen wurden.

Verpaarung	WT x WT	WT x Het	Het x Het	Het x KO	KO x KO
mittlere Anzahl Welpen je Wurf	7,5	9	5	4,7	3,5
	6	9,5	8	6,7	4,3
	10,5	8,3	6,7	8,2	7
	9	7,3	8,5	7,5	6,7
	6		9	8,2	
			3	7,3	
			7,5		
			7,7		
			7		
Anzahl Würfe	5	4	9	6	4

Tab. 3.2 Anzahl Welpen je Wurf je nach Verpaarung

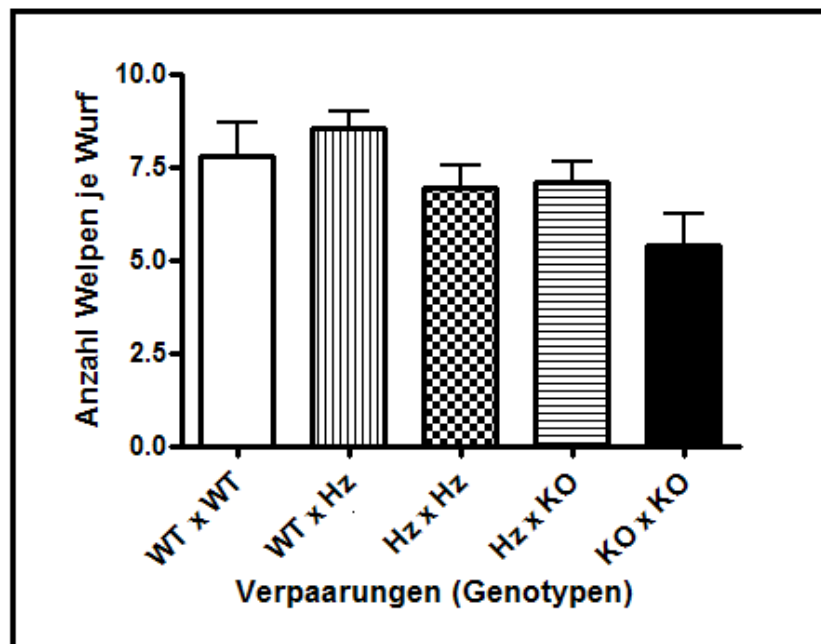


Abb. 3.2 Anzahl Welpen je Wurf vergleichend

Die statistische Überprüfung mittels 1-way-ANOVA (Kruskal-Wallis Test; Graph Pad Prism) weist keinen signifikanten Unterschied ($p=0,1134$) für die verschiedenen Genotypen nach.

3.2 Western Blot

Der Proteinnachweis mittels Western Blot soll die Expression der verwandten K2P-Kanäle TREK-1, TWIK-2 und TASK-1 bei Wildtyp und TASK-1 (-/-) Mäusen analysieren. Die möglichen Veränderungen der zellulären Kaliumhomöostase durch das Fehlen des TASK-1-Gens könnten zu kompensatorischen Veränderungen der direkt verwandten Kanäle und zu einer erhöhten Expression führen.

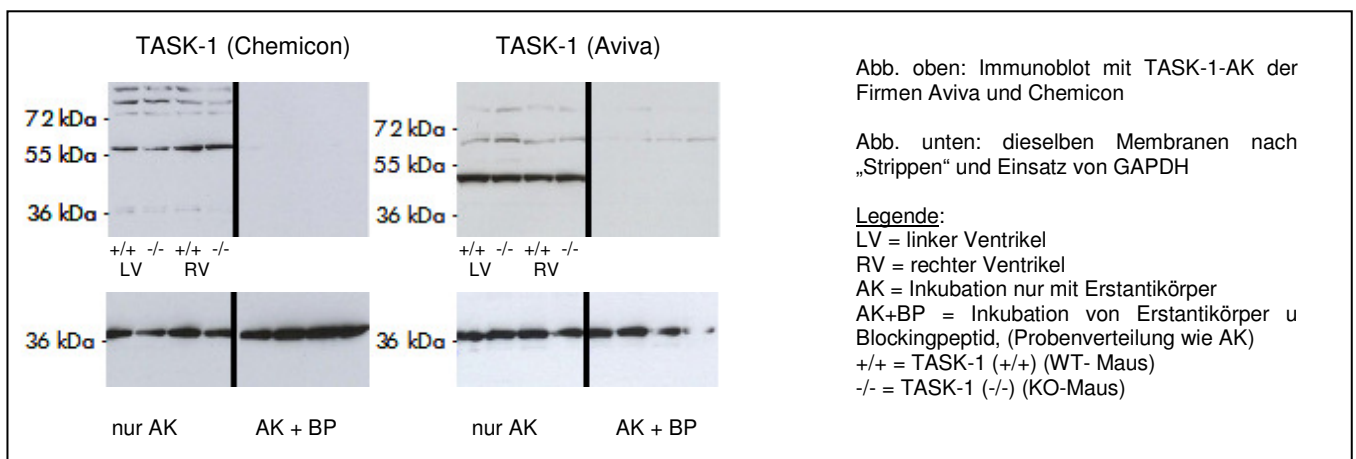


Abb. 3.3 Western Blot; Vergleichende Darstellung der zwei TASK-1 Antikörper

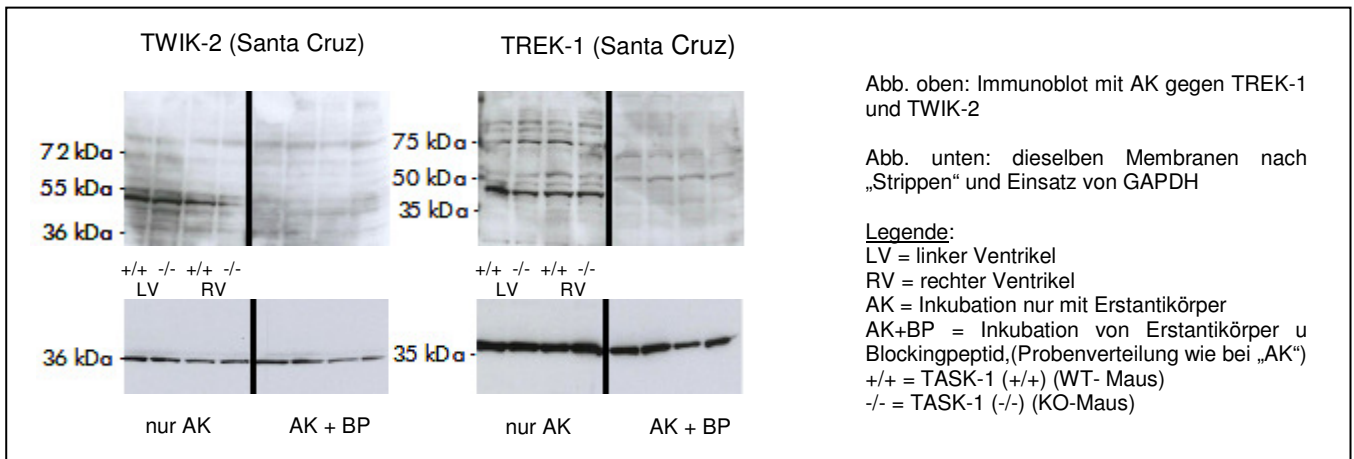


Abb. 3.4 Western Blot: TWIK-2 und TREK-1 detektierte Banden

Daher ist diese Untersuchung nicht nur als qualitativer Nachweis konzipiert, sondern durch die Verwendung eines internen Standards wird auch eine komparative Untersuchung der möglichen Konzentrationsunterschiede erreicht.

Der TASK-1-Antikörper der Firma Chemicon wurde ausgewählt, da er von Graham et al. 2006 bereits im Mäuseherzen eingesetzt wurde. Man kann aus dem Proteinlysate der Wildtyp-Maus eine Bande bei 65kDa nachweisen, die mittels Peptidkompetition zu hemmen ist. Allerdings zeigt sich in diesem Größenbereich auch eine Bande im Proteinlysate von TASK-1 (-/-)Tieren (siehe Abb. 3.3, linke Seite). Es wurde ein weiterer TASK-1-Antikörper (der Firma Aviva) eingesetzt. Auch hier kann für beide Genotypen eine Bande bei ca. 55 kDa dargestellt werden, die sich mit dem spezifischen Blockingpeptid hemmen lässt (siehe Abb. 3.3, rechte Seite). Diese Befunde bestätigen, dass diese TASK-1-Antikörper (ebenso wie andere bereits in der Arbeitsgruppe verwendete; Santa Cruz D16; N-15), nicht ausreichend spezifisch das murine TASK-1-Protein detektieren, wie es für den Antikörper der Firma Chemicon bereits an anderer Stelle beschrieben wurde (Aller et al., 2005; Zwafink, 2007).

Abb. 3.4 (linke Seite) zeigt, dass der verwendete TWIK-2-Antikörper im Western Blot eine spezifische Bande sowohl in der Wildtyp- als auch in der TASK-1 (-/-) - Proteinprobe erkennt, die nach Peptidkompetition erfolgreich blockiert ist.

Der TREK-1-Antikörper detektiert mehrere Banden, sowohl in der TASK-1 (-/-) Probe als auch in der aufbereiteten Proteinprobe von Wildtyp-Mäusen, wobei deutlich zu erkennen ist, dass eine davon mittels Peptidkompetition weggeblockt werden kann (Abb. 3.4 rechte Seite). Unter der Voraussetzung, dass die Antikörper spezifisch binden, erfolgt bei TASK-1-defizienten Tieren weder eine kompensatorische Hochregulation noch eine Expressionshemmung der nach TASK-1 im Mäuseherzen am stärksten exprimierten Kaliumkanäle.

3.3 Versuche am isolierten Herzen/Langendorff-Präparation

Die Untersuchung des isolierten, schlagenden Herzens und die Abkopplung des Organs von Bedürfnissen und Rückmeldungen des Gesamtorganismus ermöglichen die Bedeutung von TASK-1 für die kardiologischen Funktionen und Regelmechanismen zu beurteilen. Die Veränderung des Kaliumtransports durch die Zellmembran kann zu einer veränderten Repolarisationszeit führen, die wir als Verlängerung der Aktionspotentialdauer zu finden erwarten. Dafür musste zunächst vor Ort eine geeignete und reproduzierbare Messmethode etabliert werden.

3.3.1 Entwicklung geeigneter Elektroden und Stimulationsmethode

In den meisten Publikationen, die sich mit der Ableitung und Auswertung von murinen kardialen MAPs befassen, werden Elektroden nach Franz verwendet, wie die über kurze Zeit erhältliche kommerzielle Variante (Boston Scientific EP Technologies, Langendorff Probe) (Kirchoff et al 2003, Fabritz et al 2003,2004; Franz, 1999) oder auf Grundlage dieses Modells selbst hergestellte Elektroden (Knollmann et al, 2001). Zu Beginn der eigenen Etablierungsarbeiten stand uns eine einzelne Boston Scientific Elektrode zur Verfügung und es gab nur noch eine käufliche Elektrode, die bis dato primär an Ratten- und Kaninchenherzen verwendet wurde (MAP-Elektrode Fa. Hugo Sachs). Diese ist im grundsätzlichen Aufbau der Franz-Elektrode zwar vergleichbar, in ihren Dimensionen aber weitaus größer. Beide Elektroden sind bipolar, wobei das Hugo-Sachs-Modell aus einem gewundenen Draht besteht, der als afferente Elektrode in ein Silber-Chlorid-Pellet gepresst ist. Darüber liegt eine Isolationsschicht und ein weiterer Silberdraht, der die efferente Elektrode bildet und dessen Kontaktfläche seitlich liegt.

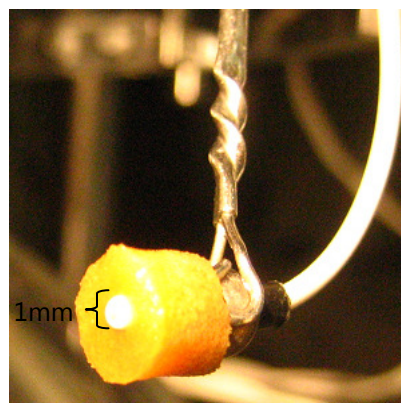
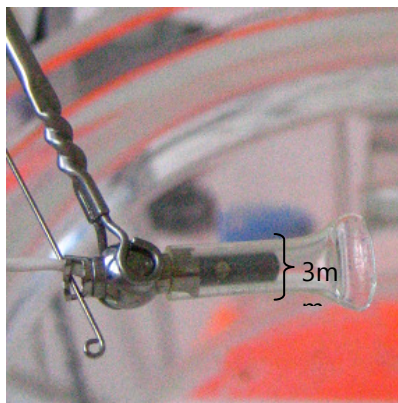


Abb. 3.5 MAP-Elektroden der Firma Hugo-Sachs® (li.) und Boston Scientific® (re)

Diese Fabrikationsmethode führt zu einer Größe von ca. 3mm Durchmesser (ohne Schwämmchen). Die Franz-Elektrode hingegen verzichtet auf die Verwendung der Pellets, stattdessen sind zwei isolierte Silberdrähte miteinander verbunden, wodurch diese Elektrode an der Spitze nur ca. 1 mm misst. Um mit beiden Elektroden die Herzoberfläche zu kontaktieren, wird auf der efferenten Elektrode ein Schwämmchen platziert, das mit Puffer getränkt ist und so eine leitfähige Brücke zu diesem Messpunkt bildet.

Durch die größere Auflagefläche der Hugo-Sachs-Elektrode entstehen drei wesentliche Probleme:

Erstens misst sie auf einem wesentlich größeren Areal, während die Idee der Ableitung von MAP darauf beruht, den Wert einer möglichst geringen Anzahl von Zellen zu messen. Zweitens ist die Anbindung an die schlagende Herzoberfläche durch ihre Größe schwerer herzustellen und konstant zu erhalten, eine stabile Signalqualität ist über längere Messzeiträume somit kaum möglich. Als Letztes ist die Amplitude der MAPs immer direkt dem Druck proportional (Franz, 1999 und eigene Messungen); also ist bei einer größeren Auflagefläche ein wesentlich größerer Kraftaufwand vonnöten, um gleich große Signale zu erhalten (Druck = Kraft pro Fläche; $p = F/A$) was zur Schädigung des Myokards (Ischämie, Drucknekrosen) und somit gegenüber der natürlichen Situation zu stärker veränderten Werten führt.

Aus diesem Grund wurden in Zusammenarbeit mit der Firma Hugo Sachs Elektroden speziell für die Anwendung am Mäuseherzen entwickelt. Der grundsätzliche Bauplan wurde erhalten, jedoch die Elektroden nicht im 90° Grad-Winkel zueinander versetzt, sondern parallel geführt.



Abb. 3.6 neu entwickelte MAP-Elektroden der Fa. Hugo Sachs

Dabei sind zwei neue Modelle entstanden, die schwingend auf einem Draht montiert sind. Der Unterschied zwischen den Modellen liegt am Schliff der Referenz-Elektrode der gerade (Abb. 3.6 rechte Seite) oder leicht angeschrägt (Abb. 3.6 linke Seite) ausgeführt wurde.

Auch diese Elektrode sollte zur Herstellung des optimalen Kontakts mit einem Schwämmchen arbeiten. Im Zuge der Etablierungsmessungen stellte sich aber heraus, dass durch Kohäsionskräfte immer zuverlässig ein Tropfen Puffer als leitende Brücke zwischen der efferenten Elektrode und der Herzoberfläche vorhanden ist. Durch die verkleinerte Auflagefläche der afferenten Elektrode und durch das kleinere Referenzgebiet war so eine erwünschte Verkleinerung des Messareals möglich. Die mit beiden Elektroden aufgezeichneten MAPs waren in Amplitude und Qualität der Boston Scientific Elektrode vergleichbar, jedoch erwiesen sich die Hugo-Sachs-Elektroden als extrem empfindlich gegenüber elektrischen Störsignalen und elektrischem Hintergrund, insbesondere wenn die Herzen stimuliert wurden.

Aus diesem Grund wurde ein drittes Modell getestet, das auf Vorlage der Franz-Elektrode von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. P. Kirchhoff von der Universitätsklinik Münster entwickelt und uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurde. Diese Mess-Elektrode vereint beide Bauprinzipien in sich: Sie besteht aus Silberdrähten, und diese werden parallel geführt.

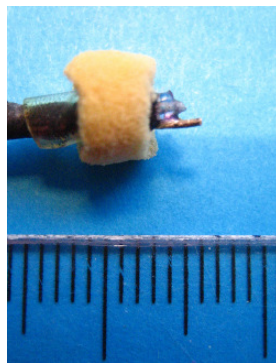


Abb. 3.7 MAP-Elektrode der Arbeitsgruppe Kirchhof (auf Basis der Franz-Elektrode)

Durch die Verwendung extrem dünner Drähte ist eine sehr geringe Auflagefläche möglich. Dadurch kann bei geringem Druck über eine relativ lange Periode eine stabile Messung ermöglicht werden. Es ist darauf zu achten, dass die sehr spitzen Drähte auch immer eine latente Gefährdung des Myokards bedeuten, da sie dort schnell zu Verletzungen oder Perforationen führen können.

Vergleichende Messungen der verbesserten Hugo-Sachs-Elektrode und der Elektrode der AG Kirchhof zeigten wiederum vergleichbare MAP, wobei die Hugo-Sachs-Elektrode jedoch sensitiver auf elektrischen Hintergrund reagierte. Um die Störungen zu eliminieren, wurde eine bessere elektrische Isolierung des Versuchsaufbaus vorgenommen. Zum einen wurde die gesamte Langendorff-Apparatur in einem Faraday'schen Käfig aufgebaut. Zum anderen wurden die von den MAP-Elektroden zum Messgerät (PowerLab 8/30) führenden Kabel

doppelt abgeschirmt (Verwendung von Antennenkabeln (RG98) und die Stimulationssignale wurden durch einen Stimulus Isolator (Universal ISO, Fa. Hugo Sachs) geführt um Artefakte durch diesen Impuls zu minimieren. Alle anderen elektrischen Geräte im Labor wurden überprüft und (falls möglich) während der MAP-Messung außer Betrieb genommen. Durch diese Maßnahmen war für beide Elektroden die Aufzeichnung qualitativ guter Signale sowohl an Herzen mit nativer Herzfrequenz (unstimuliert), als auch an elektrisch stimulierten Herzen ohne Bereinigung durch Filter möglich.

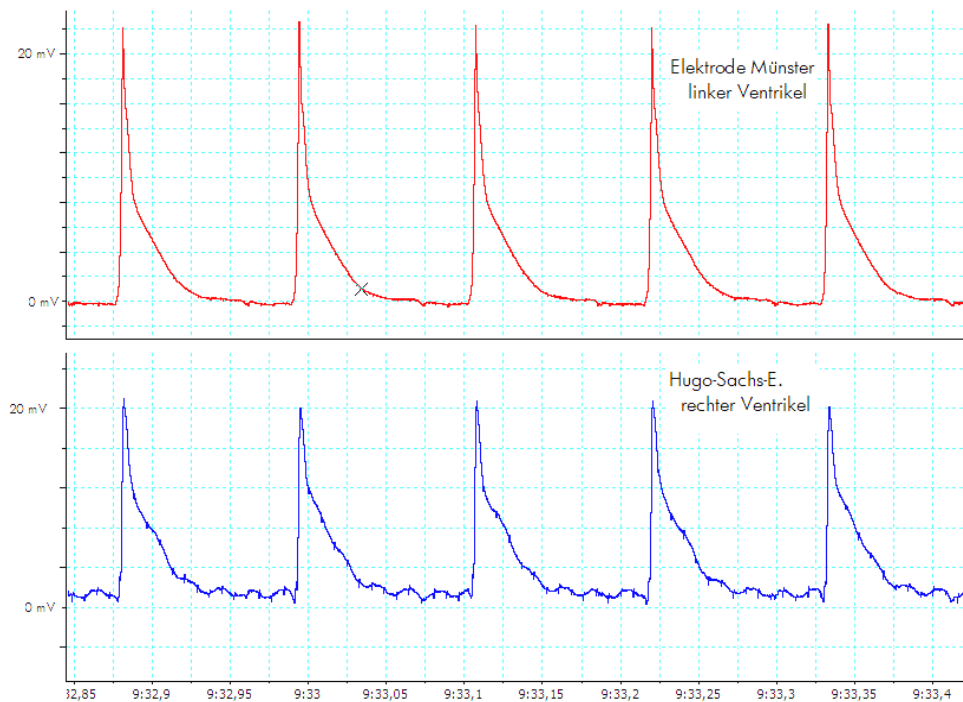


Abb. 3.8 Vergleich der MAP-Elektroden der AG Kirchhof (oben, rot) und Fa. Hugo Sachs (unten, blau)

3.3.2 Stabilität

Neben der Erhebung der oben aufgezeigten Messwerte wurden auch Vorversuche zur Stabilität der Präparation durchgeführt. Während die oben beschriebenen Messungen nur eine kurze Zeit mit angelegten Elektroden benötigen (max. 12 Minuten je Herz), sind Versuchsaufbauten mit pharmakologischer Beeinflussung des Herzens teilweise auf die doppelte oder dreifache Zeitdauer zu terminieren. Aus diesem Grund wurden einzelne Herzen länger im Messaufbau belassen und nach Anfärbung mit TTC planimetrisch untersucht. Bei den untersuchten Herzen (unabhängig vom verwendeten Elektroden-Typ oder Genotyp der Maus) waren bereits ab 15 Minuten Messzeit im Kontaktbereich der Elektrode ischämische Gebiete zu beobachten. Das unter MAP-Elektroden liegende Myokard wird aufgrund des Andrucks nach dieser Zeit nur minder- oder gar nicht durchblutet,

was theoretisch eine Veränderung des MAP zur Folge haben kann, was aber insbesondere hinsichtlich der Zuleitung von Substanzen zu berücksichtigen ist.

3.3.3 Ergebnisse

Die Messung der APD90 bei verschiedenen Frequenzen ergab bei niedrigen Pulsraten (nativ = ca. 7Hz/420 bpm und 6 Hz = 360 bpm) signifikante Unterschiede in der Repolarisationsdauer (Abb. 3.9).

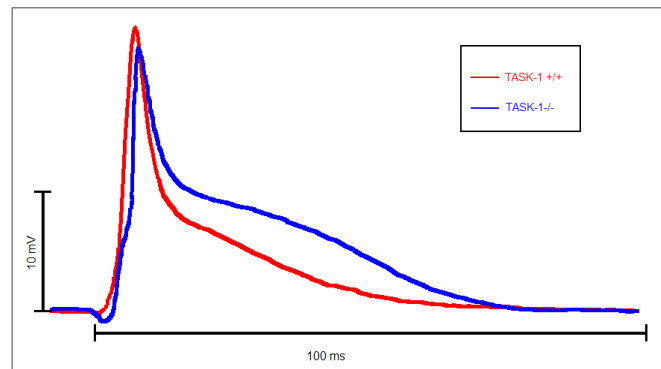
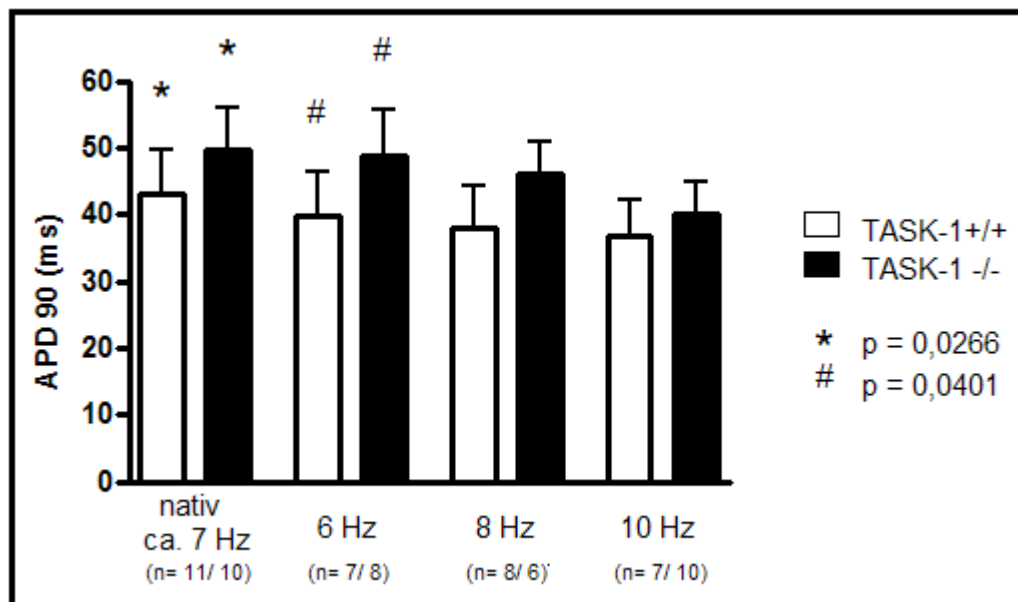


Abb. 3.9 Übereinander gelegtes natives MAP von TASK-1 (-/-) und TASK-1-(+/+) Mäusen

Bei schneller schlagenden Herzen war dieser Effekt nicht mehr nachweisbar (8Hz / 480 bpm $p = 0,0593$; 10 Hz / 600 bpm $p = 0,3148$).



	TASK-1 (+/+)	TASK-1 (-/-)	p =	n =
nativ (ca. 7 Hz)	43,13 ± 6,581	49,83 ± 6,126	0,0266	11 / 10
6 Hz	39,79 ± 6,636	48,85 ± 6,965	0,0401	7 / 8
8 Hz	38,01 ± 6,277	46,25 ± 4,588	0,0593	8 / 6
10 Hz	36,76 ± 5,582	39,95 ± 4,902	0,3148	7 / 10
12 Hz	34,60 ± 3,843	36,89 ± 2,913	0,1903	9 / 9

Abb. 3.10 APD90 bei verschiedenen Herzfrequenzen, grafische und tabellarische Darstellung

Mit diesem Experiment konnte eine frequenzabhängige Verlängerung der Aktionspotentialdauer bei den TASK-1 (-/-) Herzen nachgewiesen werden.

3.4 Echokardiographie

Die Untersuchung des Herzens mittels Ultraschall dient dem Nachweis struktureller Veränderungen des Organs und damit verbundener Funktionseinschränkungen. Das Ausschalten des TASK-1-Kanals als relativ dezente Manipulation auf molekularer Ebene lässt keine strukturellen Veränderungen erwarten. Gleichzeitig ist es aber wichtig, diese sicher auszuschliessen, da jede anatomische Abweichung auch zu Veränderungen der elektrophysiologischen Werte und unter Umständen auch zu Expressionsänderungen bei anderen Kaliumkanälen führen kann.

Es wurden insgesamt 20 Tiere je Genotyp echokardiografisch untersucht. Bei keinem der Tiere liessen sich strukturelle Fehlbildungen feststellen. Weder für die Herzfrequenz (Heart rate, HR), noch für

- die Dicke des interventrikulären Septums, endsystolisch (IVSs),
- den Durchmesser des linken Ventrikels, endsystolisch und enddiastolisch (LVIDs, LVIDd)
- den Durchmesser der linksventrikulären Hinterwand, endsystolisch und enddiastolisch (LVPWs, LVPWd) noch bei den daraus errechneten Daten
- die Verkürzungsfraktion (SF)
- die relative Wandstärke (RWT, Relative Wall Thickness) und
- die Masse des linken Ventrikels (LV Mass)

konnte ein statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden (siehe Tabelle 3.3).

	TASK-1 (+/+) (n= 20)			TASK-1 (-/-) (n= 20)			
HR (bpm)	530	±	65	590	±	30	*
IVSd (mm)	0,74	±	0,09	0,66	±	0,09	n.s.
LVEDs (mm)	3,18	±	0,4	3,11	±	0,42	n.s.
LVEDd (mm)	1,86	±	0,36	1,78	±	0,42	n.s.
LVHWs (mm)	0,94	±	0,11	0,93	±	0,09	n.s.
LVHWd (mm)	0,77	±	0,08	0,77	±	0,1	n.s.
SF (%)	41,6	±	5	43	±	6	n.s.
LV Mass (mg)	76	±	21	68	±	18	n.s.
RWT	0,48	±	0,06	0,47	±	0,08	n.s.

Tabelle 3.3 Echokardiografische Werte von TASK-1 (+/+) und TASK-1 (-/-) Mäusen vergleichend

3.5 Anthropometrische Analysen

Eine Veränderung der kardialen Funktion kann grundsätzlich auch mit einfachen gravimetrischen Maßen nachzuweisen sein. So wird sich beispielsweise eine Hypertrophie des Herzmuskels in erhöhtem Gewicht des Herzens und einer erhöhten Herzgewicht zu Körpergewicht-Ratio niederschlagen. Aus diesem Grund wurden auch gravimetrische Untersuchungen vorgenommen.

Zur Bestimmung der Körperindizes wurden 16 TASK-1 (-/-) und 15 TASK-1 (+/+)-Mäuse untersucht. Als Parameter wurden Körpergewicht, Herzgewicht, das Verhältnis Herzgewicht zu Körpergewicht und das Verhältnis Herzgewicht zu Tibiallänge ausgewertet.

Keiner der Parameter zeigte einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Genotypen, insbesondere das Verhältnis Herzgewicht zu Tibiallänge war als absolute Messgröße zwischen den Gruppen vergleichbar.

	TASK-1 (+/+) (n=15)			TASK-1 (-/-) (n=16)			
Körpergewicht (g)	33,2	±	7,7	36,5	±	6,7	n.s.
HGW (g)	0,17	±	0,04	0,18	±	0,03	n.s.
HGW/ KGW	0,005	±	0,001	0,005	±	0,001	n.s.
HGW/ TL	0,091	±	0,022	0,101	±	0,017	n.s.

HGW = Herzgewicht; KGW = Körpergewicht; TL = Tibiallänge

Tab. 3.4 Anthropometrische Werte vergleichend

3.6 Telemetrie/Elektrophysiologie

Um das gesamte Leistungsspektrum der Tiere ausreichend darstellen zu können, sind verschiedene Formen von EKGs abgeleitet worden: Die telemetrisch aufgezeichneten Daten gliedern sich in 24-Stunden-EKGs (die die tägliche Lebenssituation der Tiere optimal widerspiegeln) und Belastungs-Untersuchungen (Laufen, Schwimmen, pharmakologische Belastung). Außerdem wurden Oberflächen-EKGs unter verschiedenen leichten Narkosen (bei denen Reflexe schwach erhalten bleiben und eine mittlere Herzfrequenz messbar ist) und Narkosen gewonnen um mögliche Unterschiede zwischen den Genotypen aufzuzeigen. Ziel der Untersuchung war es, mögliche Unterschiede hinsichtlich des Vorkommens von Herzrhythmusstörungen zu detektieren, insbesondere ob das Fehlen von TASK-1 eine veränderte Empfindlichkeit dafür generiert.

3.6.1 24-Stunden-EKGs

Die Auswertung der Langzeit-EKGs erfolgt nach Tag- und Nachtzyklus, um aktive und inaktive Phasen getrennt beurteilen zu können.

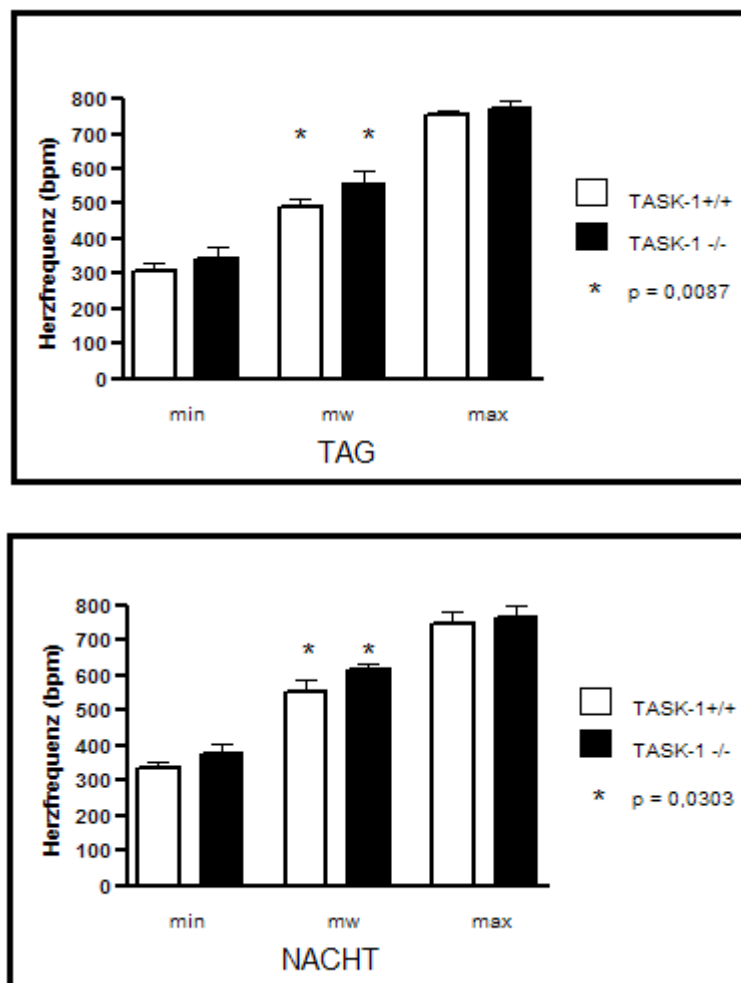


Abb. 3.11 Vergleichende Darstellung der minimalen, mittleren und maximalen Herzfrequenz im Tag und Nachtzyklus

Bei den mittleren Herzfrequenzen ist ein signifikanter Unterschied zwischen Genotypen unabhängig vom Aktivitätsstatus nachweisbar, während minimale und maximale Herzfrequenzen im Tag- und Nachtzyklus bei den WT und TASK-1 (-/-) Mäusen keinen statistisch signifikanten Unterschied aufweisen.

	min. Herzfrequenz (bpm)		mittl. Herzfrequenz (bpm)		max. Herzfrequenz (bpm)	
	TASK-1 (+/+)	TASK-1 (-/-)	TASK-1 (+/+)	TASK-1 (-/-)	TASK-1 (+/+)	TASK-1 (-/-)
TAG	306,0 ± 25,26	341,6 ± 36,50	491,7 ± 23,94	556,7 ± 35,73	754,2 ± 13,59	773,8 ± 19,54
NACHT	336,8 ± 17,72	373,6 ± 28,71	554,9 ± 34,78	615,2 ± 17,48	746,8 ± 34,44	765,2 ± 34,77
n =	6	5	6	5	6	5

Tabelle 3.5 Herzfrequenzen über 24 Stunden vergleichend jeweils Mittelwert +/- Standardabweichung

3.6.2 Belastungs-EKGs

3.6.2.1 Schwimmen

Alle im Schwimmversuch gestarteten Tiere waren in der Lage, das Schwimmprotokoll abzuschließen, wobei jede Maus Schwimmhilfen in Anspruch genommen hat oder mindestens einmalig durch Halten an der Schwanzspitze wieder in eine waagerechte Schwimmposition gebracht werden musste. Alle Tiere sind kurzzeitig auch getaucht.

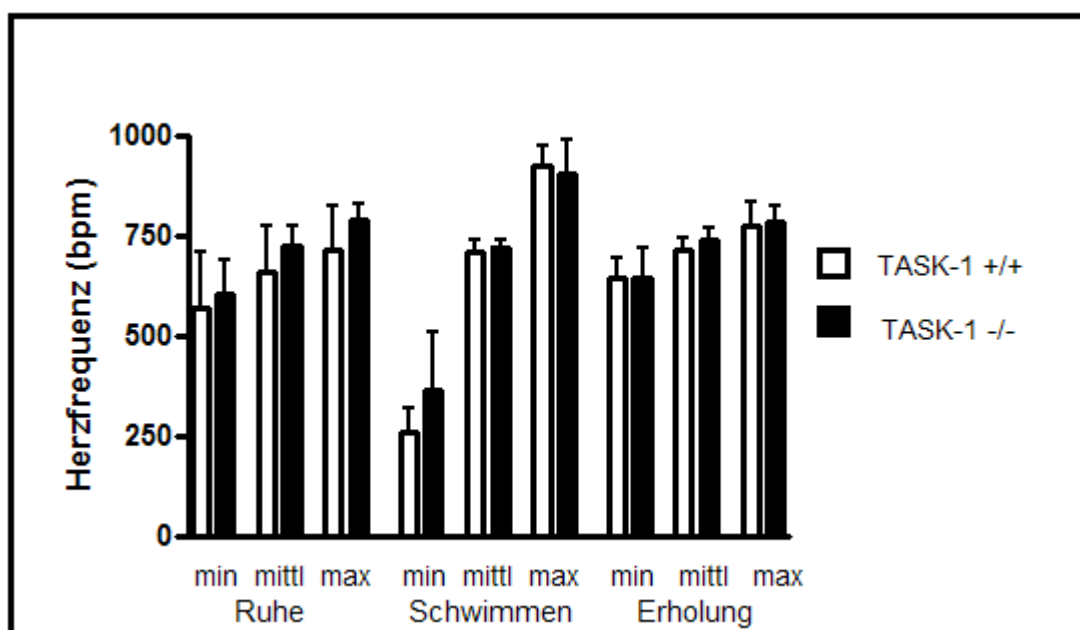


Abb. 3.12 Herzfrequenzen während des Schwimmversuchs

Hinsichtlich minimaler, mittlerer und maximaler Herzfrequenz oder des Auftretens von Arrhythmien konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen TASK-1 (-/-) und WT-Mäusen festgestellt werden.

Beide Genotypen zeigten während des Tauchens Pausen (bis zu 300 ms RR-Abstand), woraus auch die niedrige minimale Herzfrequenz resultiert.

3.6.2.2 Laufbandergometrie

Das Laufbandprotokoll ist als Belastungstest bis an die Leistungsgrenze der Mäuse konzipiert; der dazu direkt korrelierende Wert ist die absolute Zeit auf dem Laufband. Im Mittel wurde von den Wildtypen eine Laufzeit von 1272 \pm 144,4 s und eine maximale Geschwindigkeit von 12,17 m/s erreicht. Bei den TASK-1 (-/-) Tieren lag die maximale Geschwindigkeit bei 12,99 m/s und die durchschnittliche Zeit auf dem Laufband bei 1282 \pm 143,4 s. Dies entspricht einem p-Wert von 0,3139 im Mann-Whitney-Test und ist somit nicht als statistisch signifikanter Unterschied zu werten.

Außerdem wurden die minimale, die mittlere und die maximale Herzfrequenz vor der körperlichen Belastung und während des Laufens gemessen und das Auftreten von Arrhythmien beurteilt. Direkt im Anschluss an die Belastung wurden die Tiere adrenerg mit Dobutamin/ Epinephrin stimuliert, sodass hier keine Werte zur Nachbelastungszeit vorliegen.

	min HF		mittlere HF *; p = 0,0022		max HF	
	TASK-1 (+/+)	TASK-1 (-/-)	TASK-1 (+/+)	TASK-1 (-/-)	TASK-1 (+/+)	TASK-1 (-/-)
RUHE	537,0 \pm 130,5	547,0 \pm 127,5	667,0 \pm 133,8	708,5 \pm 138,8	723,2 \pm 129,7	794,5 \pm 136,0
LAUFEN	512,7 \pm 134,7	550,8 \pm 111,6	736,2 \pm 29,1	783,5 \pm 16,4	883,5 \pm 35,7	1058,7 \pm 372,7
n =	6	6	6	6	6	6

Tabelle 3.6 Herzfrequenzen während des Laufbandversuches; Herzfrequenz als Mittelwert \pm Standardabweichung

Zwischen den Gruppen waren hinsichtlich des Auftretens von Rhythmusstörungen keine Unterschiede festzustellen. Die Herzfrequenzen zeigten bis auf die mittlere Herzfrequenz während des Laufens (p = 0,0022) im Mann-Whitney-Test keine statistisch signifikanten Unterschiede.

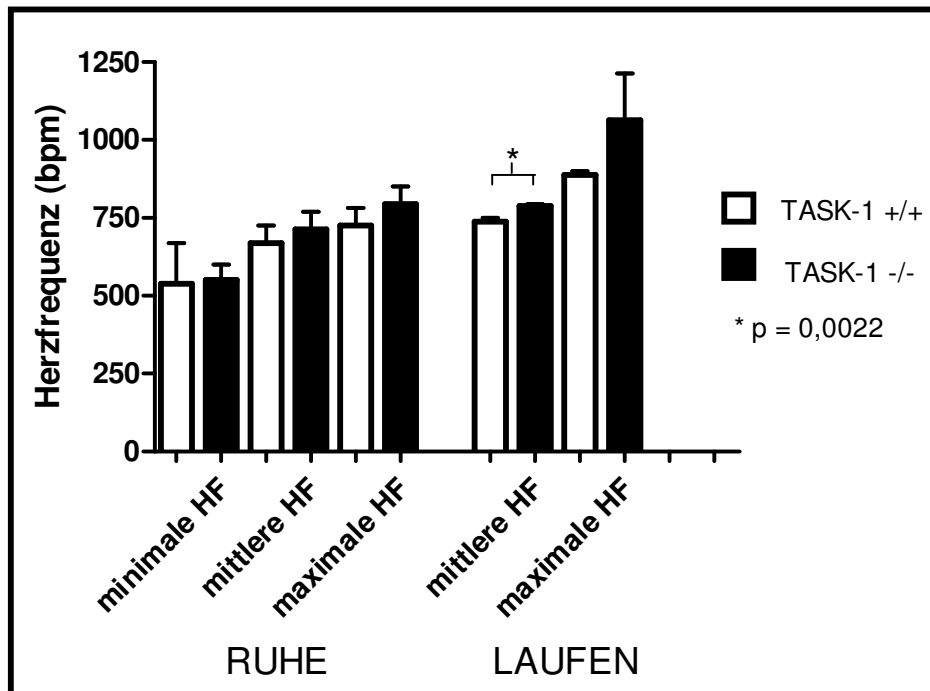


Abb. 3.13 Herzfrequenzen während des Laufbandversuchs

3.6.2.3 Pharmakologische Belastung mit Dobutamin und Epinephrin

Im direkten Anschluss an das Laufen wurde den Tieren intraperitoneal Dobutamin und Epinephrin injiziert, um zu prüfen, ob dadurch Herzrhythmusstörungen ausgelöst werden können und um mögliche Differenzen in der Reaktion auf diese Pharmaka zu testen.

Alle Mäuse zeigten unter beiden Medikamenten Unwohlsein und Tachypnoe; beide Symptome waren unter Epinephrin wesentlich ausgeprägter. Außerdem wurde die Bewegungsaktivität und Putzintensität auf ein Minimum reduziert; unter der Einwirkung von Epinephrin (bis ca. 30 Minuten post injektionem) ging sie gegen null.

Beide Substanzen haben bei allen Mäusen Herzrhythmusstörungen verursacht. Es waren verbreiterte QRS-Komplexe, Extrasystolen bis hin zu Salven, Pausen und AV-Blöcke zu beobachten. Um diese Werte zu quantifizieren, wurden sie mithilfe der Herzfrequenzmessung auf vergleichbare Indizes reduziert. Aufgrund der hohen Variabilität und des Auftretens von Extraschlägen oder Pausen ist dabei die Standardabweichung insgesamt hoch, aber für alle Gruppen vergleichbar, sodass eine ausreichende Interpretationssicherheit gegeben ist.

Unter Epinephrin waren alle Rhythmusstörungen, insbesondere das Auftreten von Pausen und AV-Blocks, wesentlich ausgeprägter, ohne dass eine der beiden Gruppen darin

augenscheinlich stärker betroffen war. Dies zeigt sich auch bei der Auswertung der Herzfrequenzen.

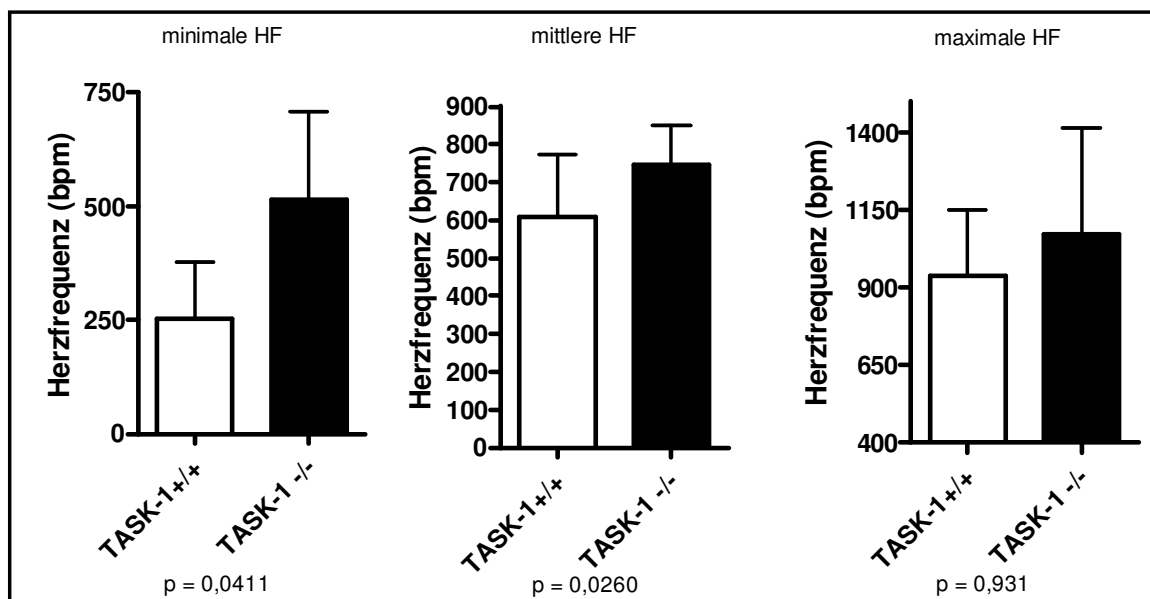


Abb. 3.14 Herzfrequenzen unter Dobutamin

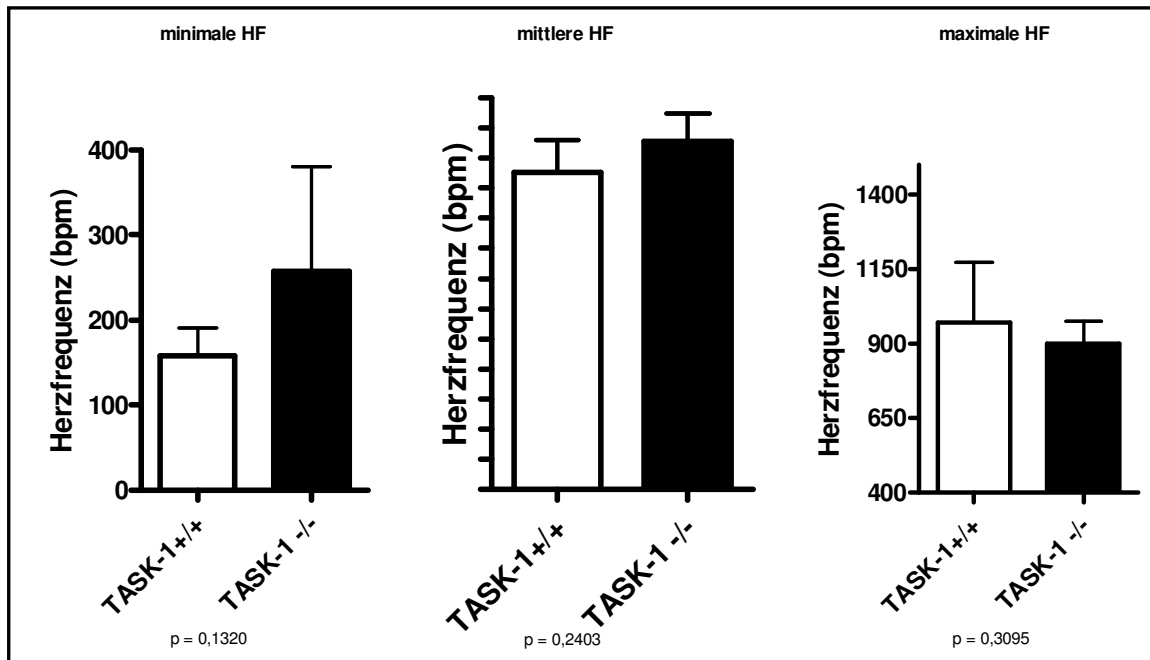


Abb. 3.15 Herzfrequenzen unter Epinephrin

Die unter Epinephrin erwartete Beschleunigung des Pulses konnte nicht beobachtet werden, vielmehr haben alle Tiere eine ausgeprägte Bradykardie, von Extrasystolen und Salven kurzzeitig unterbrochen, gezeigt.

Insgesamt waren bei den telemetrisch gewonnenen Daten im Bereich der minimalen und maximalen Werte keine signifikanten Unterschiede nachzuweisen. Die TASK-1 (-/-)Tiere weisen häufig statistisch signifikant höhere mittlere Herzfrequenzen als ihre Wildtyp-Wurfgeschwister auf.

3.7 Oberflächen-EKGs

Neben den telemetrisch, am wachen Tier aufgezeichneten EKGs, wurden auch Oberflächen-EKGs unter verschiedenen Narkosen/Sedierungen aufgezeichnet. Zur Auswertung wurde nur die qualitativ beste und markanteste Ableitung II verwendet, wobei für jedes Tier über 70 konsekutive Herzschläge folgende Parameter ermittelt wurden:

- Herzfrequenz, HF (bpm)
- P Dauer (ms)
- PR Interval (ms)
- QRS Breite (ms)
- QTcZeit (ms) – nach Mitchell korrigierte QT Zeit

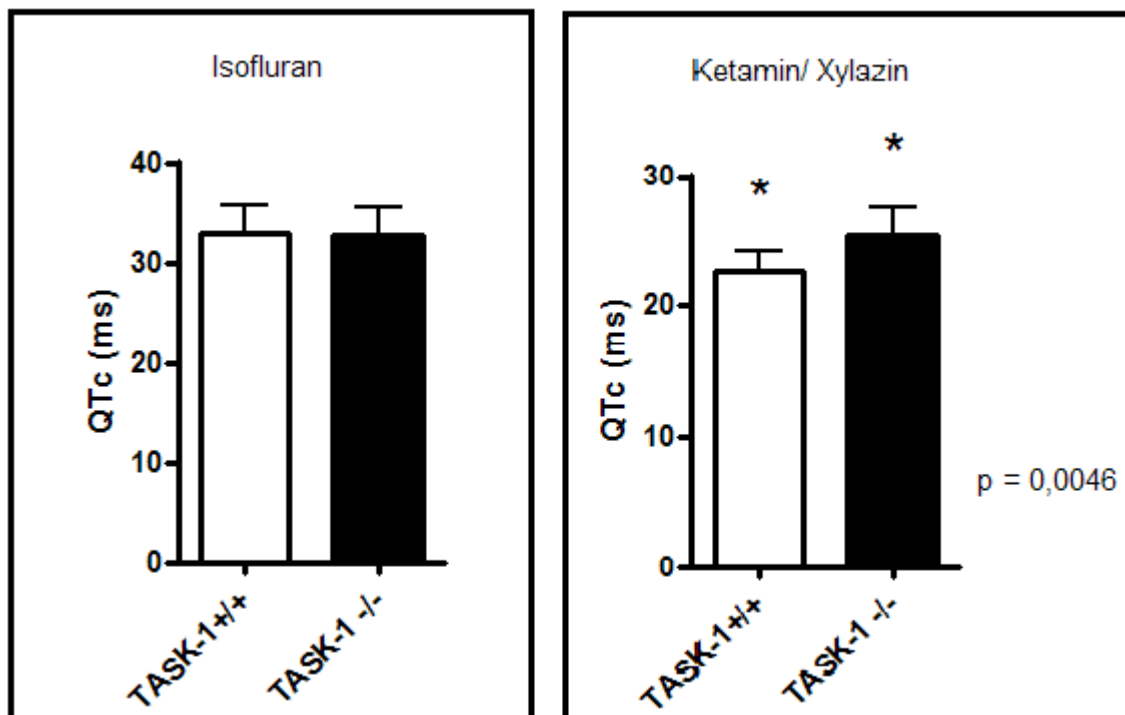


Abb. 3.16 Frequenzkorrigierte QT-Zeit unter verschiedenen Narkosen

	Ketamin / Xylazin				Isofluran							
	TASK-1 (+/+)	TASK 1 (-/-)				TASK-1 (+/+)		TASK 1 (-/-)				
HF (bpm)	309,8±62,07	391,2	±	79,06	n.s.	529,8	±	64,89	590,4	±	30,05	*
P Welle, Dauer (ms)	8,503±1,437	8,652	±	1,747	n.s.	9,682	±	1,409	9,908	±	2,253	n.s.
PR Intervall (ms)	43,64±3.955	47,48	±	2,329	*	40,32	±	4,385	40,58	±	4,596	n.s.
QRS, Breite (ms)	11,87±0,742	11,72	±	0,677	n.s.	10,38	±	1,273	9,735	±	1,812	n.s.
QTc (ms)	22,76±1,452	25,61	±	1,873	*	32,93	±	2,8	32,77	±	2,732	n.s.
n =	7	10				18		15				

* = statistisch signifikant $p < 0,05$

Tabelle 3.7: EKG-Auswertung unter verschiedenen Narkosen

3.8 Heart Rate Variability

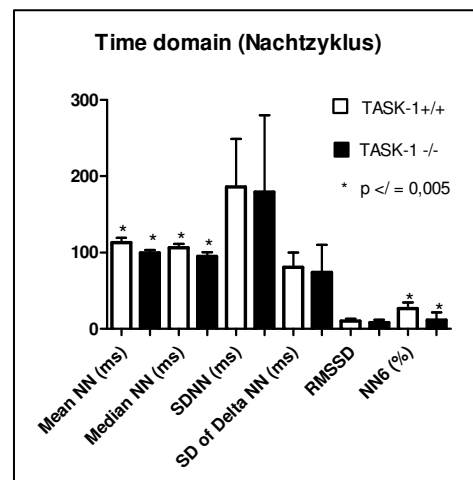
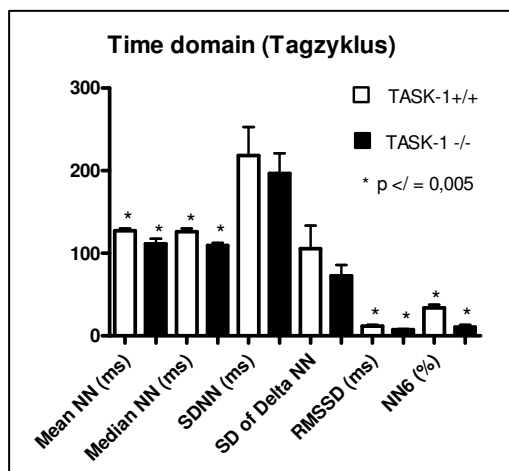
Beim Menschen gilt eine herabgesetzte Herz-Frequenz-Variabilität als Indikator für ein höheres Risiko, ein kongestives Herzversagen zu entwickeln oder einen spontanen Herztod zu erleiden. Bei vorbelasteten Patienten, zum Beispiel nach einem Myokardinfarkt, gilt eine niedrige HRV als Risikomarker für eine erhöhte Mortalität (Thireau et al., 2007). Außerdem ist die HRV ein sehr sensibler Parameter, der bereits verändert sein kann bevor andere Symptome augenscheinlich werden. Da die zu erwartenden Veränderungen bei den TASK-1 (-/-) Mäusen durchaus diskret sein können, ist die Bestimmung der HRV eine Möglichkeit einen sensiblen Frühmarker zu nutzen.

Die Auswertung der HRV erfolgte für den Tag- und Nachtzyklus getrennt und nach zwei Methoden: Der deskriptiv-statistischen „Time domain analysis“ und der über Fast Fourier Transformation errechneten „Frequency domain analysis“.

Die Ergebnisse der Time domain analysis zeigen für beide Zyklen (Tag/inaktiv und Nacht/aktiv) signifikante Unterschiede der mittleren Herzfrequenz und des Medians, jeweils als RR-Abstand gemessen bei vergleichbarer Standardabweichung dieser Parameter. Unabhängig vom Beobachtungszeitraum zeigt sich bei den TASK-1-defizienten Mäusen ein verkürztes RR-Intervall (Mean NN), also eine höhere mittlere Herzfrequenz als bei den TASK-1 (+/+)-Tieren. Ein weiterer signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen zeigt sich in der Abweichung konsekutiver normaler RR-Intervalle (NN6), die bei den TASK-1 (-/-) Mäusen deutlich geringer ist. Bei allen signifikant unterschiedlich gefundenen Werten sind die als Post-Analyse durchgeführten F-Tests hinsichtlich der Varianzen der Stichprobe negativ.

			TASK-1 (+/+) (n =6)	TASK 1 (-/-) (n =6)	p =	F-Test
TAG	Mean NN	* (ms)	127,20 ± 6,418	111,10 ± 6,498	0,0015	neg
	Median NN	* (ms)	126,10 ± 9,114	109,30 ± 7,222	0,0053	neg
	SDNN	(ms)	218,50 ± 84,51	196,50 ± 60,28	0,6991	/
	SD of delta NN		105,70 ± 68,14	72,74 ± 31,94	0,3939	/
	RMSSD	* (ms)	11,98 ± 3,363	7,27 ± 2,38	0,0187	neg
	NN6	* (%)	33,75 ± 9,433	10,48 ± 6,226	0,0005	neg

* = statistisch signifikant p<0,05



			TASK-1 (+/+) (n =6)	TASK 1 (-/-) (n =6)	p =	F-Test
NACHT	Mean NN	* (ms)	113,00 ± 6,366	99,52 ± 3,746	0,0012	neg
	Median NN	* (ms)	106,20 ± 5,228	94,78 ± 5,698	0,0047	neg
	SDNN	(ms)	186,20 ± 62,64	179,00 ± 100,9	0,4848	/
	SD of delta NN		80,72 ± 19,24	73,85 ± 35,98	0,3095	/
	RMSSD	(ms)	10,48 ± 2,538	8,02 ± 3,88	0,3095	/
	NN6	* (%)	26,75 ± 7,816	11,54 ± 9,795	0,0149	neg

Abb. 3.16 Ergebnisse der Time domain analysis grafisch und tabellarisch

Die Analyse der gekürzten und manuell korrigierten Datensätze (die primär für die frequency domain-Auswertung genutzt wurden) zeigt für alle untersuchten Parameter statistisch signifikante Unterschiede:

				TASK-1 (+/+) (n =6)	TASK 1 (-/-) (n =6)
TAG	Mean NN	(ms)	**	113,00 ± 6	100,00 ± 4
	SDNN	(ms)	***	9,00 ± 1	3,00 ± 1
	RMSSD	(ms)	**	9,00 ± 3	2,00 ± 1
	NN6	(%)	***	29,00 ± 2	1,00 ± 1
				TASK-1 (+/+) (n =6)	TASK 1 (-/-) (n =6)
NACHT	Mean NN	(ms)	**	127,00 ± 6	111,00 ± 6
	SDNN	(ms)	**	7,00 ± 1	4,00 ± 1
	RMSSD	(ms)	***	7,00 ± 1	3,00 ± 1
	NN6	(%)	***	36,00 ± 5	5,00 ± 3

* = statistisch signifikant $p < 0,002$ ** = statistisch hochsignifikant $p < 0,0001$

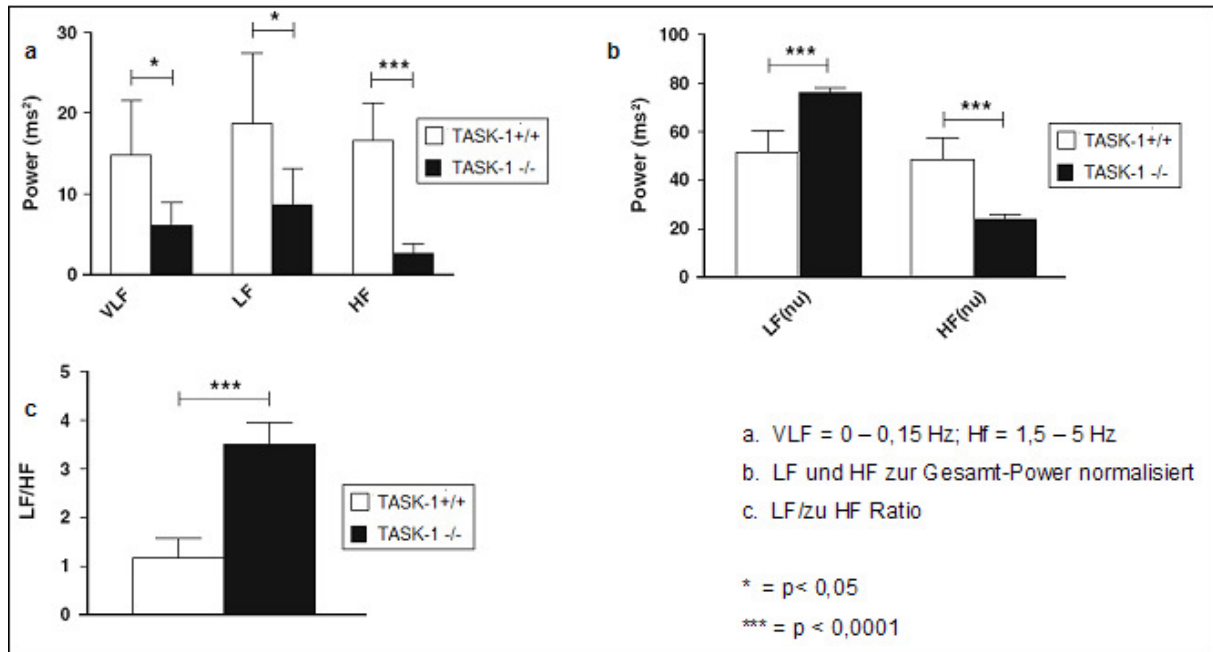
Abb. 3.17 Ergebnisse der manuell korrigierten Datensätze der Time domain analysis

Durch die Einengung der Datenmenge verkleinert sich die statistische Breite. Es wird aber an Trennschärfe gewonnen, da weniger interpolierte Schläge auszuwerten sind.

Bei der anschließenden Beurteilung der Frequency domain analysis bestätigen sich diese Ergebnisse und weisen für alle getesteten Parameter signifikante Unterschiede zwischen Genotypen auf (siehe Abb. 3.18).

			TASK-1 (+/+) (n = 6)	TASK-1 (-/-) (n = 6)
Power (ms ²)	VLF	* (0 - 0,15 Hz)	14,77 ± 2,77	6,16 ± 1,15
	LF	* (0,15 - 1,5 Hz)	18,69 ± 3,56	8,7 ± 1,84
	HF	*** (1,5 - 5 Hz)	16,67 ± 1,91	2,62 ± 0,51
	LF/HF	***	1,16 0,16	3,51 0,18

Tab. 3.8: Ergebnisse der Frequency domain analysis, tabellarisch



* = statistisch signifikant, $p < 0,05$; *** = statistisch hochsignifikanz, $p < 0,0001$

Abb. 3.18 Ergebnisse der Frequency domain analysis, grafisch

Insgesamt zeigt die Analyse, dass TASK-1-defiziente Mäuse eine verringerte Herz-Frequenz Variabilität aufweisen.

3.9 TASK-1 im Rahmen von Ischämie und Reperfusion

Mit diesem Versuch sollte der Einfluss von pathologischen Ereignissen bei TASK-1 (-/-) und nicht merkmals tragenden Tieren untersucht werden. Theoretisch kann die TASK-1-Defizienz die Größe des ischämischen Gebietes beeinflussen, insbesondere da Studien vorliegen, die eine verzögerte Reaktion auf Hypoxie im Gesamtorganismus nachweisen (Trapp et al., 2008).

Bei diesem Versuch wurden mehr TASK-1 (-/-) Tiere eingeplant, um einer theoretisch möglichen höheren Mortalität der merkmals tragenden Mäuse entgegenzusteuern. Letztlich zeigten sich die TASK-1 (-/-) Tiere im Versuch ebenso robust, wie ihre TASK-1 (+/+)-Wurfgeschwister.

Auch im Bereich der Infarktgrößen ließ sich zwischen den Gruppen kein statistisch signifikanter Unterschied nachweisen:

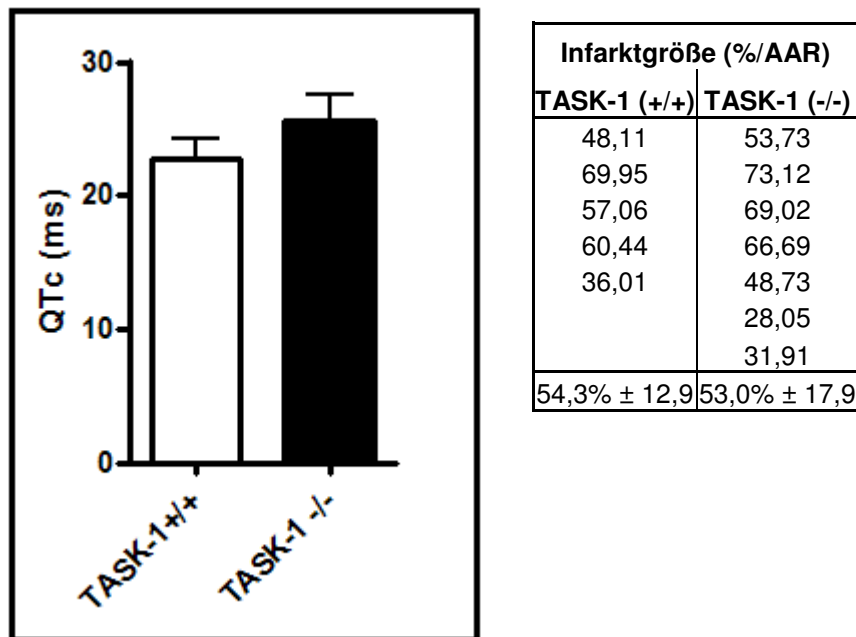


Abb. 3.19 Infarktgröße vergleichend, grafisch und tabellarisch

Die Größe der Area at risk (AAR) war in beiden Gruppen konstant. Somit lässt sich keine protektive Wirkung einer TASK-1-Defizienz im Rahmen von ischämischen Ereignissen nachweisen:

AAR (%/total area)	(mw ± SD)
TASK-1 (+/+) (n= 5)	50,54 +- 13,53
TASK-1 (-/-) (n=7)	48,84 +- 9,161

Obwohl die Messung der Infarktgröße als relativer Parameter zur AAR eventuelle Schwankungen der Herzgröße oder Parameter ausgleicht, ist die Konstanz der Größe der AAR noch einmal eine Absicherung für die Reproduzierbarkeit und Korrektheit des Einzelversuchs.

4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkung der TASK-1-Defizienz auf die Struktur und Funktion des Herzens unter besonderer Berücksichtigung möglicher Herzrhythmusveränderungen zu untersuchen. Darüber hinaus wurden die autonome Regulation der Herzfrequenz und das Verhalten bei lokalen kardialen Insulten untersucht. Dafür wurden Methoden in vivo und in vitro genutzt die hier in Reihenfolge der bereits dargestellten Ergebnisse diskutiert werden.

4.1 TASK-1-defiziente Tiere

Die Auswertung des Zuchtbuches zeigt für die homozygoten TASK-1 (-/-) Tiere eine geringere Lebenserwartung als für heterozygote Mäuse oder Tiere ohne TASK-1-Defizienz, obwohl im Rahmen der vorgelegten Untersuchungen kein konkreter Hinweis auf die mögliche Ursache zu finden ist. Denkbar sind hormonelle Störungen (Hyperaldosteronismus; Davies et al. 2008) oder größere Sensitivität auf äußere Reize hinsichtlich Atmung und Herzarbeit, die sich altersabhängig zeigen. Aus dieser Perspektive könnte eine Langzeitstudie von zwei oder drei entsprechenden Probandengruppen (TASK-1 (-/-), TASK-1 (+/+), Hz) mit Überwachung der entsprechenden Parameter (Blutwerte, Echokardiografie, EKG) hilfreich sein.

4.2 Western Blot

Die durchgeführten Untersuchungen mit den kommerziell erhältlichen TASK-1-Antikörpern (Firma Aviva und Chemicon) sowie die Nachweise von TREK-1 und TWIK-2 (Santa Cruz) mittels Western-Blot haben keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen gezeigt. Bei allen untersuchten Tieren ließen sich die jeweiligen Proteinbanden detektieren und auch mit einem spezifischen Blocking-Peptid hemmen. Außerdem konnte durch den Einsatz eines internen Standards (Housekeeper) sichergestellt werden, dass gleiche Proteinmengen eingesetzt waren. Eine kompensatorische Hochregulation von TREK-1 und TWIK-2 ließ sich nicht nachweisen.

Es ist aber zu berücksichtigen, dass es möglich war, TASK-1-Protein in den mittels PCR negativ getesteten (TASK-1 (-/-) genotypisierten) Tieren nachzuweisen. Die für das humane TASK-1 konzipierten Antikörper scheinen für das murine Protein unspezifisch zu sein und Artefakte zu produzieren.

Diese Annahme wird durch ähnliche Befunde (Aller et al. 2005) und durch parallele Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe (Diplomarbeit C. Zwafink/Dissertation A. Hüning) gestützt, bei der die Expression verwandter K2P-Kanäle bei TASK-1 (-/-) Mäusen per real-time PCR untersucht wurde. Neben der Bestätigung der TASK-1 Defizienz lies sich dort auch eine stärkere Expression von TWIK-2 in den Ventrikeln nachweisen.

Da die verwendeten Antikörper von Graham et al, 2006 und Jones et al., 2002 zur Untersuchung der zellulären Lokalisation eingesetzt worden sind, wurden Vorversuche an histologischen Schnitten von Mäuseherzen durchführt. Dort konnte in immunfluoroskopischen Untersuchungen unabhängig vom Genotyp das gleiche Färbemuster gezeigt werden, was weiterhin für eine nicht ausreichende Spezifität der Antikörper spricht. Wegen der geringen Eignung der vorhandenen Antikörper wurden die Untersuchungen nicht weitergeführt. Daher ist es uns zurzeit auch nicht möglich, abschließende Aussagen zur zellulären Lokalisation von TASK-1 am Herzen zu treffen.

4.3 Versuche am isolierten Herzen / Langendorff-Präparation

Monophasische Aktionspotentiale erlauben die extrazelluläre Messung und Darstellung der Aktions- und Repolarisationsverläufe am intakten Herzen und sind dabei ebenso genau wie die Messung von transmembranalen Aktionspotentialen (TAP) (Franz, 1999; Knollmann 2001), die aber die Präparation von Einzelzellen (Patch-Clamp-Experiment) erfordern. Dadurch erlauben MAP-Messungen eine Untersuchung der Repolarisationszeit in vivo und theoretisch sogar unter physiologischen Umständen, wenn die Untersuchung mittels Herzkatheter am narkotisierten Patienten vorgenommen wird, so wie es an Humanpatienten durchgeführt wurde (Franz, 1994). Indem die Untersuchung sich von der Einzelzelle auf das gesamte Organ erweitert, ist es möglich, Aussagen zu regionalen Unterschieden oder auch zur Erregungsweiterleitung im gesamten Organ zu treffen.

Aufgrund seiner besonderen Funktionsweise als vom ein Membranpotential unabhängig geöffneter Kalium-Kanal ist es wahrscheinlich, dass TASK-1 zur Aufrechterhaltung des kardialen Membranpotentials und zur Repolarisation beiträgt. Einige Arbeiten identifizieren TASK-1 als verantwortliche Struktur zur Leitung des an den Kardiomyozyten messbaren I_{Kp}-Stroms (Nerbonne et al., 2001; Backx und Marban, 1993), der an isolierten ventrikulären Herzzellen von Meerschweinchen zur Aktionspotentialdauer beiträgt. Außerdem konnte an isolierten murinen Herzzellen auch eine Beteiligung von TASK-1 bei der Entstehung von „early afterdepolarisations“ nachgewiesen werden (Besana et al., 2004; Putzke et al., 2007;

Barbuti et al., 2002), die in vivo ein Risikofaktor für die Entstehung von Tachyarrhythmien sein können.

Um diese Ergebnisse am ganzen Organ zu prüfen, wurden Versuche am isolierten Herzen mittels Langendorff-Präparation durchgeführt. Dabei wurde die 90%ige Repolarisation (entspricht der 90%igen Aktionspotentialdauer, APD90, siehe Abb. 2.12) bei unterschiedlichen Frequenzen gemessen. Bei spontan schlagenden Herzen lässt sich eine niedrigere Herzfrequenz als in vivo messen, da kein äußerer Einfluss auf den Sinusknoten stattfindet. Sie lag bei unseren Versuchen unabhängig vom Genotyp bei ca. 420 bpm, also ca. 7Hz. Sowohl bei den spontan schlagenden Herzen als auch bei den mit niedriger Frequenz stimulierten Organen (8Hz) konnte bei den TASK-1 (-/-) Tieren eine signifikante Verlängerung der APD 90 nachgewiesen werden. Solche Repolarisationsstörungen gelten als potenzielles Risiko und mögliche Ursache von Herzrhythmusstörungen, die wir in diesem Experiment aber nicht beobachten konnten.

Bei einer Schlagfrequenz von über 500 bpm (8 Hz) gleichen sich die ADP90 bei den unterschiedlichen Genotypen aneinander an und es sind keine Unterschiede mehr erkennbar. Neuere Studien zeigen, dass die APD caniner und humaner Myozyten revers mit der Frequenz korrelierten (Bárándi et al., 2010). Diese physiologische Modulation der APD führt dazu, dass bei höheren Frequenzen keine Unterschiede zwischen den Genotypen mehr nachzuweisen sind.

Damit ist es gelungen, die Ergebnisse aus Untersuchungen mit isolierten Kardiomyozyten auf das Gesamtorgan zu übertragen.

4.4 Echokardiografie

Es sind altersabhängige morphologische Veränderungen des Herzens bei Tieren mit Kaliumkanaldefizienzen beschrieben worden, zum Beispiel erhöhter Blutdruck oder gesteigerte Kontraktilität im Alter von 2 bis 4 Wochen und im Alter von 10 bis 12 Wochen bereits Hinweise auf Herzversagen mit Hypertrophie und Erweiterung der Ventrikel (Wickenden et al., 1999). Diese Tiere zeigen jedoch auch generell einen deutlich vom Wildtyp abweichenden Phänotyp, und zwar dahin gehend, dass sie bei Einsetzen des Herzversagens entsprechende klinische Symptome wie Bewegungsunlust, Dyspnoe und auch generalisierte Ödeme aufweisen. Die Studien von Heitzmann et al. (2008) und Davies et al. (2008) konnten bei TASK-1-defizienten Tieren Hyperaldosteronismus und moderate Hypertension nachweisen. Daher besteht die Möglichkeit, dass die genetisch veränderten

Mäuse eine Herzvergrößerung, insbesondere des linken Ventrikels aufweisen und in höherem Alter ggf. auch Funktionseinschränkungen des Herzens haben. Diese konnten wir nicht nachweisen. Außerdem konnten wir mittels Echokardiografie überprüfen, dass die TASK-1 (-/-) Mäuse mit den bislang publizierten Normwerten für den Mäusestamm korrelieren.

Während die morphologischen Werte und Funktionsparameter keinen Unterschied zwischen den TASK-1 (-/-) und ihren unveränderten Geschwistern nachweisen konnten und auch mit bereits publizierten Werten übereinstimmten, ließ sich zeigen, dass die Herzfrequenz während der Messung bei den TASK-1 (-/-) Tieren deutlich höher war (590 vs. 520 bpm). Die höhere Herzfrequenz ist auch bei weiteren Untersuchungen zu finden (Oberflächen EKG, Heart Rate Variability, siehe Kapitel 3.7 und 3.8) und ist möglicherweise ein Indiz für einen erhöhten Sympathikotonus der TASK-1 (-/-) Tiere.

4.5 Gravimetrie

Die untersuchten Indizes Körpergewicht, Herzgewicht, Herz : Körpergewicht-Ratio und Herzgewicht : Tibia-Ratio zeigten keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Genotypen. Dies legt nahe, dass, obwohl TASK-1 in multiplen Organsystemen exprimiert wird (Herz, ZNS, glatte Muskulatur von Pulmonal- und Mesenterialarterien, Glomus caroticum, Glomerulosazellen der Nebennierenrinde; Nieren, Haut, Hoden, Lunge, Dünndarm und Magen [(Bayliss et al., 2003; Buckler et al., 2000; Guernsey et al., 2003; Gardener et al., 2004; Cjirjak et al., 2000; Duprat et al., 1997)], sein Fehlen keine offensichtlichen Auswirkungen auf Größe und Gewicht der Tiere hat.

4.6 Telemetrische Untersuchung

4.6.1 24-Stunden-EKGs und Belastungs-EKGs

Bei den telemetrisch aufgezeichneten EKGs an den sich frei bewegenden Mäusen wurden Herzfrequenzen und das Auftreten von Arrhythmien während einer Periode von 24 Stunden und unter Belastung auf dem Laufband oder beim Schwimmen ausgewertet.

Bei keinem der Tiere konnten während der Aufzeichnung des Langzeit-EKGs oder unter körperlicher Belastung Arrhythmien gefunden werden; vereinzelt zeigten Tiere beider

Gruppen Extrasystolen (<5/24h) oder Pausen (<2/h). Obwohl TASK-1 (-/-) Mäuse schlechtere Koordination und geringeren Gleichgewichtssinn als ihre Wildtyp-Wurfgeschwister zeigen (Aller et al. 2005), konnten bei unseren Untersuchungen die TASK-1-defizienten Tiere ebenso gut wie ihre Wildtyp-Geschwister auf dem Laufband Laufen oder Schwimmen. Weder im Zuge des Schwimmens, das für die Tiere körperliche Anstrengung mit erheblichen psychischen Stress kombiniert, noch bei maximaler physischer Belastung, die durch ein Rampenprotokoll auf dem Laufband erreicht wurde, zeigte keines der Tiere Koordinations- bzw. Gleichgewichtsstörungen oder verringerte Laufzeit. Die absolute Zeit auf dem Laufband, die erreichte Geschwindigkeit und der Neigungswinkel waren für beide Gruppen ohne signifikanten Unterschied. Trotz starker Belastung hat keines der Tiere (in beiden Gruppen) Herzrhythmusstörungen entwickelt.

Obwohl gerade die Kalium-Regulation für die ungestörte und rhythmische Herzarbeit essenziell ist, scheint das alleinige Fehlen von TASK-1 kein höheres Risiko für Herzrhythmusstörungen unter normaler Belastung oder körperlicher Anstrengung zu bergen. Möglicherweise kann die Rolle von TASK-1 durch andere Kanäle kompensiert werden. Gegebenenfalls bedarf es weiterer Faktoren (zum Beispiel Fieber, Entzündung, Hypoxie), um die elektrophysiologisch messbaren Unterschiede in Störungen des Erregungsablaufes münden zu lassen.

4.6.2 Medikamentöse Stimulation nach körperlicher Belastung

Nach dem Laufbandprotokoll wurden die Mäuse pharmakologisch belastet. Mittels intraperitonealer Applikation von Dobutamin und Epinephrin sollte untersucht werden, ob TASK-1-defiziente Tiere eine höhere Suszeptibilität für Arrhythmien aufweisen. Obwohl bei allen Tieren starke Störungen des Herzrhythmus aufgetreten sind, war kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen nachweisbar. Dobutamin hatte einen geringeren Effekt als Epinephrin.

Obwohl für die Epinephrin eingesetzte Dosierung an anderer Stelle zu Beschleunigung der Herzfrequenz und Tachyarrhythmien führte (Mohler et al., 2003), ist bei der hier vorgestellten Untersuchung das Gegenteil, nämlich bei allen Tieren eine Bradyarrhythmie aufgetreten. Es trat innerhalb der ersten 3 Minuten nach Verabreichung eine deutliche Verlangsamung der Herzfrequenz mit Pausen bis zu 375ms (entspräche 160 bpm) auf. Ähnliche paradoxe Reaktionen auf Epinephrin wurden im Zusammenhang mit dem Einsatz des Medikaments als Sperrkörper bei Lokalanästhesie beschrieben und es ist zu vermuten, dass eine

Gegenregulation durch Barorezeptor-Reflexe (Betzold-Jarisch-Reflex) (Sia et al, 2003; Martinek 2004) diese Veränderung bewirkt hat.

Untersucht man die Epinephrinwirkung ergänzend mittels Herzfrequenzanalyse (Daten nicht gezeigt, Dissertation S. Petric) weisen die TASK-1 (-/-) bereits vor Injektion ein verkürztes Normintervall auf, das sich unter Epinephrin noch deutlich verstärkt. Dies bedeutet, dass die TASK-1-defizienten Tiere einen reduzierten Barorezeptor-Reflex aufweisen.

4.7 Oberflächen-EKGs

Die Aufzeichnung von Oberflächen-EKGs erfolgte unter verschiedenen Narkosen und zeigte in Abhängigkeit der verwendeten Medikamente unterschiedliche Ergebnisse.

a.) Narkose mit Isofluran

Mit Ausnahme der Herzfrequenz (TASK-1 (-/-) 590 ± 30 bpm; TASK-1-(+/+) 529 ± 65 bpm) sind bei den gemessenen Werten keine statistisch signifikanten Unterschiede festzustellen. Es ist aber zu berücksichtigen, dass Isofluran TASK-1 aktiviert (Sirois et al., 2000; Talley et al., 2002; Patel et al 1999), sodass die TASK-1 (+/+) Tiere durch die Narkose eine Funktionsmodulation dieses Kanals zeigen und daher zur Zeit der Messung möglicherweise funktionell als TASK-1 (-/-) Mäuse zu werten sind und somit dieselben Zeiten und Intervalle in beiden Gruppen gemessen werden. Alternativ ist auch eine stärkere Aktivierung der TASK-3 und TREK-1-Kanäle bei den TASK-1 (-/-) Tieren denkbar, was die fehlende TASK-1-Wirkung kompensieren und die QT-Zeit wieder egalisieren würde.

b.) Narkose mit Ketamin/Xylazin

Obwohl Ketamin bei Untersuchungen von isolierten Myozyten der Rate K_{ATP} hemmt und konzentrationsabhängig eine Verlängerung der Aktionspotentialdauer verursacht (Ko et al., 1997), sollte das bei beiden Genotypen im gleichen Maße auftreten und somit zu vernachlässigen sein. Im Gegensatz zur Isofluran-Narkose zeigt sich in dieser Untersuchung eine signifikante Verlängerung der QT-Zeit in der frequenzkorrigierten Berechnung nach Mitchell (QTc), bei den TASK-1 (-/-) Mäusen, also eine verlängerte Repolarisation. Dieser Befund ist das in-vivo-Korrelat zur Verlängerung der APD_{90} in den Versuchen am isolierten Herzen und unterstreicht die mögliche Bedeutung von TASK-1 im Rahmen der Erregungsrückbildung.

Die große Heterogenität und Vielzahl von Kaliumkanälen bedingt, dass die Modifikation eines einzelnen Kanals sehr unterschiedliche Auswirkungen haben kann. Beispielsweise ist die Mutation eines spannungsabhängigen Kaliumkanals (KCNQ1/ KCNE1) für die Ausprägung des lebensbedrohlichen Long-QT-Syndroms verantwortlich und Mäuse, die entsprechende Mutationen tragen, zeigen auch deutlich verlängerte QT-Zeiten und teilweise auch weitere Auffälligkeiten wie erhöhte Sensibilität auf Substanzen, z.B. Isoproterenol (Knollmann et al., 2004) oder erhöhten Blutdruck (Takagi et al., 2007). Genauso zeigen auch Kir 6.2-null-Mäuse, bei denen selektiv ein ATPsensitiver Kaliumkanal ausgeschaltet wurde, bei Belastungsversuchen mittels transversaler Aorteneinengung verlängerte Aktionspotentialdauer, erhöhten enddiastolischen Druck im linken Ventrikel und nach 2 Tagen kongestives Herzversagen, während die Kontrollmäuse keines der Symptome zeigten (Yamada, et al., 2006).

Im Gegensatz dazu weisen Knock-out-Mäuse, bei denen der spannungsabhängige Kv 4.3 - Kanal ausgeschaltet wurde, in der Studie von Niwa et al., 2008 keine signifikanten Unterschiede zu ihren Wildtyp-Geschwistern auf.

Häufig sind die genveränderten Tiere unter normalen Lebensumständen zunächst nicht von ihren gesunden Wurfgeschwistern zu unterscheiden und erst unter spezifischen Belastungen oder mit speziellen Untersuchungsmethoden können phänotypische Unterschiede identifiziert werden. Das humanmedizinische Korrelat sein (zum Beispiel beim Long-QT-Syndrom), dass die betroffenen Patienten völlig unauffällig sind und unerwartet einen plötzlichen Herztod erleiden, der sich allenfalls in einer intermittierend auftretenden Verlängerung der QT-Zeit ankündigt.

Im Fall der TASK-1-defizienten Maus ist die Verlängerung der korrigierten QT-Zeit und der Aktionspotentialdauer sowie die veränderte Herzfrequenzvariabilität (siehe unten) ein möglicher Risikofaktor für Arrhythmien. Mit den von uns durchgeführten Untersuchungen und Belastungen der Tiere ließ sich ein solches jedoch nicht induzieren. Möglicherweise bedarf es eines zusätzlichen Auslösers wie zum Beispiel Stress, Fieber, Entzündung oder Ähnliches (siehe 4.6).

4.8 „Heart Rate Variability“

Bei allen bisherigen Auswertungen der EKG- und Echokardiographie-Daten ist auffällig, dass die TASK-1 (-/-) Mäuse durchweg eine höhere maximale Herzfrequenz als ihre Wildtyp-Wurfgeschwister aufwiesen. Neben dem reduzierten Barorezeptor-Reflex kann ein erhöhter

Sympathikotonus diese Veränderung bewirken. Zur genaueren Analyse wird zunehmend die Herzfrequenzvariabilität verwendet (Thireau et al., 2007; Gehrmann et al., 2000), die wir zur Beurteilung der autonomen Herzregulation verwendet haben.

Bei der Berechnung der Time-domain-Parameter zeigte sich bei den TASK-1-defizienten Mäusen ein verkürztes RR-Intervall, ein höhere mittlere Herzfrequenz sowie deutliche Verkürzung der RMSSD und der pNN6 als bei den Wildtyp-Tieren. Diese Ergebnisse bestätigen bisherigen Feststellungen und bekräftigen die Vermutung, dass die KO-Tiere einen höheren Sympathikotonus aufweisen.

In allen Werten der Frequency-domain zeigten die TASK-1-defizienten Mäuse eine deutlich reduzierte Power gegenüber den Wildtypen, was zunächst nur einen Hinweis auf geringere Herzfrequenzvariabilität liefert. Der höhere LF/HF-Quotient ist aber wiederum ein Indikator für erhöhte sympathische Aktivität, ebenso wie der geringere pNN6 (siehe oben) eine Verringerung der parasympathischen Aktivität bei den TASK-1 (-/-) Tieren vermuten lässt.

Es ist also festzustellen, dass die genetisch veränderten Mäuse eine eingeschränkte Herzfrequenzvariabilität aufweisen, auch wenn die dazu führenden Mechanismen noch unbekannt sind. Neuere Studien (Davies et al. 2008) weisen bei juvenilen und älteren weiblichen TASK-1 (-/-) Mäusen Hyperaldosteronismus nach. Der dadurch erhöhte Blutdruck könnte sich negativ auf die HRV auswirken.

Vor diesem Hintergrund gewinnt die elektrische Stabilität der Mäuseherzen weiteres Gewicht, da klinische HRV-Studien (human) bei verringerter HRV und erhöhtem LF/HF-Quotienten durchweg ein höheres Risiko für kardiale Arrhythmien und plötzlichen Herztod aufweisen (Task Force 1996).

4.9 Myokardinfarkte

Der Verschluss von Gefäßen führt zur Sauerstoffunterversorgung und pH-Wert-Senkung in den betroffenen Arealen, beides Konditionen, die Einfluss auf TASK-1-Kanäle nehmen (Duprat et al., 1997; Trapp et al., 2008). Ischämie kann außerdem zu β -adrenerger Stimulation und damit verbunden zu einem erhöhten Auftreten von Arrhythmien führen, insbesondere wenn bereits Abweichungen vom normalen Repolarisationsverlauf nachzuweisen sind (Thomas et al., 2004). Meuth et al., 2009 zeigte bei transientem Verschluss (30 Min) der mittleren cerebralen Arterie (tMCAO) dass TASK-1-defiziente Tiere

einen wesentlich höheren Schaden davontragen als TASK-1 (+/+) Mäuse, TASK-1 bei cerebellarer Ischämie also eine protektive Wirkung hat.

Die vergleichbare Situation am Herzen, bei der wir einen temporären Verschluss der LAD vorgenommen hatten, zeigte aber keine Unterschiede zwischen den Genotypen.

5. Zusammenfassung

TASK-1 gehört zu den Tandem-Kaliumkanälen und wird vor allem am Herzen und im ZNS exprimiert, wo der sogenannte „background channel“ zur Stabilisierung des Aktionspotentials beiträgt. Seine Funktion wird von verschiedenen physiologischen und pathologischen Prozessen sowie unterschiedlichen Pharmaka beeinflusst. Zum besseren Verständnis der Funktion von TASK-1 am Herzen ist eine kardiale Phänotypisierung von TASK-1-defizienten Mäusen vorgenommen worden. TASK-1 (-/-) Mäuse zeigen eine leicht erhöhte Mortalität gegenüber genetisch unveränderten Tieren. Die Wurfstärke als Maß für die Fertilität ist gegenüber anderen Mäusen unverändert. Der Proteinnachweis mittels Western-Blot zeigt keine kompensatorisch veränderte Expression verwandter K²P-Kanäle (TWIK-2; TREK-1). An TASK-1 (-/-)Mäusen kann mittels Echokardiografie keine veränderte Herzmorphologie oder funktionelle Störung nachgewiesen werden. Gravimetrische Parameter (Verhältnis Herzgewicht zu Tibia) entsprechen dem zugrunde liegenden Mäusestamm. Die Aktionspotentialdauer (APD₉₀) ist bei Messungen am spontan schlagenden und am stimulierten isolierten Herzen signifikant verlängert. Bei körperlichen Belastungen (Schwimmen/Laufen auf dem Laufband) zeigen sich die Tiere normal belastbar weisen aber eine höhere mittlere Herzfrequenz auf. Bei telemetrisch abgeleiteten 24-Stunden-EKGs ist eine höhere mittlere Herzfrequenz, aber keine Erhöhung spontan auftretender Arrhythmien nachweisbar. Oberflächen-EKGs zeigen eine Verlängerung der frequenzkorrigierten QT-Zeit. TASK-1-defiziente Mäuse zeigen eine deutlich reduzierte Herzfrequenzvariabilität sowohl in der time domain- als auch der frequency domain Analyse. Bei Insulten des Myokards (Ischämie/Reperfusion) zeigen TASK-1-defiziente Mäuse vergleichbar große Infarktbereiche und Überlebensraten wie TASK-1 (+/+) Mäuse. Die vorgelegten Untersuchungen zeigen, dass TASK-1 zur Repolarisation des kardialen Aktionspotentials und in vivo zur Aufrechterhaltung der Herzfrequenzvariabilität beiträgt.

6. Summary

TASK-1 is a two-pore (K2P) potassium channel mainly expressed in the nervous system and in the heart where it contributes to action potential stabilisation being a so called “background channel”. Functionally TASK-1 is influenced by several physiological and pathological conditions as well as pharmacologic substances. For a better understanding of the exact function of TASK-1 in the heart we conducted a cardiac phenotyping of TASK-1 deficient (TASK-1 (-/-)) mice. TASK-1 (-/-) animals show a lightly increased mortality in comparison to genetically unaltered animals. Littersize as indicator for fertility is comparable to TASK-1 (+/+) animals. Protein detection via Western Blot analysis did not show altered expression of related K2P-channels (TWIK-2, TREK-1). Echocardiography did not reveal changes in heart morphology or functional abnormalities. Gravimetric studies (heartweight : tibia-ratio) corresponded to the underlying mouse strain. Action potential duration (APD₉₀) in spontaneous beating or stimulated isolated hearts was significantly prolonged. Concerning physical exercise (swimming/ running on a treadmill) the animals displayed a normal capacity though they showed higher mean heart rates. In telemetric acquired 24-hour-ECGs a higher mean heart rate was obvious but no higher incidence of arrhythmias could be shown. Surface ECGs reveal a prolonged rate corrected QT interval. TASK-1 deficient mice have a significantly decreased heart rate variability in time domain- as well as in frequency domain - Analysis. Insults of the myocardium via ischemia/reperfusion result in comparable infarct sizes and survival as in TASK-1 (+/+) mice. The presented data show that TASK-1 contributes to cardiac repolarization and in vivo it maintains heart rate variability.

7. Abkürzungsverzeichnis

2D	Zweidimensional
AAR	Area at risk
Abb.	Abbildung
Abl II	Zweite Ableitung nach Einthoven
AG	Antigen
AK	Antikörper
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
APD	Action potential duration; engl.; Aktionspotential-Dauer
aqua millipore	aqua millipore; destilliertes Wasser
AV	Atrio-Ventrikulär
BP	Blocking-Peptid
bpm	beats per minute, engl.; Schläge pro Minute/ Pulsfrequenz
bzw.	Beziehungsweise
Carbogen	Gemisch aus 95% reinem Sauerstoff (O ₂) und 5% Kohlendioxid (CO ₂)
ca.	circa (lat)
cm	centimeter
CPVT	catecholaminerge polymorphe ventrikuläre Tachykardie
DNA	desoxyribonucleic acid, engl; Desoxyribonukleinsäure (DNS)
ECL	enhanced chemiluminescence
EKG	Elektrokardiogram
EMG	Elektromyogram
ES	Extrasystole
ES-Zellen	Embryonale Stammzellen
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
GUS	β-Glukoronidase
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
HRPO	Horseradish peroxidase; Meerrettich-Peroxidase
HRV	Heart Rate Variability, engl; Herzfrequenzvariabilität
Het	heterozygot / mischerbig
Hz	Hertz; Schwingungen/ Schläge pro Sekunde
i.p.	intraperitoneal
I.U.	International Units
IA	Infarct area

IVS	Interventrikuläres Septum
K2P	Tandem/ Two-pore- K-channel, engl.
kb	Kilobasen
kDA	kilo Dalton; Maßeinheit für Proteingröße
kg	Kilogramm
KO	knock-out
l	Liter
LAD	Left Anterior descendent
LQTS	Long-QT-Syndrom
LV	Linker Ventrikel
LVID	Left ventricle inner diameter; Innedurchmesser des linken Ventrikels
LVPW	Left ventricle posterior wall, Hinterwand des linken Ventrikels
m/s	meter pro Sekunde
MAP	Monophasisches Aktionspotential
MES	2-(n-Morpholino)ethanolsulfonsäure
MEZ	Mitteleuropäische Zeit
MHz	Mega-Hertz; Schwingungen pro Sekunde *1000
MI	Myokardinfarkt
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmHg	millimeter Quecksilbersäule (als Druckeinheit)
M-Mode	Time-Motion-Mode
MOPS	3-(N-Morpholino)prpansulfonsäure
NBT	Nitro Blue Tetrazolium
NDS	Normal donkey serum
nm	Nanometer
PAF	Platelet activating factor
PBS	Phosphate Buffered Saline Solution
PCR	Polymerase chain reaction, engl; Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonucleic Acid; engl.; Ribonukeinsäure, RNS
RNAse	Ribonuklease, Enzyme (Nukleasen), die die Hydrolyse von Ribonukleinsäuren in kleinere Fra
rpm	rounds per minute/ Umdrehungen pro Minute
RT-PCR	real-time Polymerase Chain reaction, engl.
RV	Rechter Ventrikel
s.c.	subcutan

SDS	Natriumlaurylsulfat
s	Sekunde
SF	Shortening fraction; Verkürzungsfraction
SQTS	Short-QT-Syndrom
TAP	Transmembranales Aktionspotential
THIK	Tandem pore domain halothane-inhibited K-channel
TREK	TWIK-related k-channel
TRH	thyreotropin releasing hormone
TRP	Transient Receptor Potential channels
TTC	Triphenyltetrazoliumchlorid
TWIK	Tandem of P domains in a weak inward rectifier k-channel
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
WT	Wildtyp
ZNS	Zentralnervensystem

8. Literaturverzeichnis

Abriel H, Zaklyazminskaya EV (2013)

Cardiac channelopathies: genetic and molecular mechanisms

Gene; 517(1):1-11; Review

Aller MI, Veale EL, Linden AM, Sandu C, Schwaninger M, Evans LJ, Korpi ER, Mathie A, Wisden W, Brickley SG (2005):

Modifying the subunit composition of TASK channels alters the modulation of a leak conductance in cerebellar granule neurons.

J Neurosci.;25(49):11455-67

Aller MI, Wisden W (2008):

Changes in expression of some two-pore domain potassium channel genes (KCNK) in selected brain regions of developing mice.

Neuroscience.;151(4):1154-72.

Amman D (2003):

Transgene Tiere als Krankheitsmodelle.

Erweitertes Manuskript zum Vortrag anlässlich der 3. Tierversuchstagung: Tierversuche in Frage gestellt.

„Pro Tier“, Zeitung der Schweizerischen Gesellschaft für Tierschutz ; Ausgabe 4/ 2003: 6-9; Schweizer Tierschutz ST, Olten

Antzelevitch C, Pollevick GD, Cordeiro JM, Casis O, Sanguinetti MC, Aizawa Y, Guerchicoff A, Pfeiffer R, Oliva A, Wollnik B, Gelber P, Bonaros EP Jr, Burashnikov E, Wu Y, Sargent JD, Schickel S, Oberheiden R, Bhatia A, Hsu LF, Haïssaguerre M, Schimpf R, Borggrefe M, Wolpert C. (2007):

Loss-of-function mutations in the cardiac calcium channel underlie a new clinical entity characterized by ST-segment elevation, short QT intervals, and sudden cardiac death.

Circulation.;115(4):442-9

Backx PH, Marban E (1993):

Background potassium current active during the plateau of the action potential in guinea pig ventricular myocytes.

Circ Res.;72(4):890-900.

Bárándi L, Virág L, Jost N, Horváth Z, Koncz I, Papp R, Harmati G, Horváth B, Szentandrassy N, Bányász T, Magyar J, Zaza A, Varró A, Nánási PP (2010):

Reverse rate-dependent changes are determined by baseline action potential duration in mammalia and human ventricular preparations.

Basic Res cardiol 105(3):315-23

Barbuti A, Ishii S, Shimizu T, Robinson RB, Feinmark SJ (2002):

Block of the background K⁺ channel TASK-1 contributes to arrhythmogenic effects of platelet-activating factor.

Am J Physiol Heart Circ Physiol; 282(6):H2024-30

Bayliss DA, Sirois JE, Talley EM (2003):

The TASK-family: Two-pore domain background K⁺ channels.

Molecular interventions 3: 205-219. Review

Bayliss DA, Barrett PQ (2008):

Emerging roles for two-pore-domain potassium channels and their potential therapeutic impact.

Trends Pharmacol Sci; 29(11):566-75. Review

Bednarczyk P (2008)

Potassium channels in brain mitochondria

Acta Biochim Pol; 56(3): 385-92. Review

Besana A, Barbuti A, Tateyama MA, Symes AJ, Robinson RB, Feinmark SJ (2004):

Activation of protein kinase C epsilon inhibits the two-pore domain K⁺ channel, TASK-1, inducing repolarization abnormalities in cardiac ventricular myocytes.

J Biol Chem 279(32):33154-60

Bockenhauer D, Zilberberg N and Goldstein SAN (2001):

KCNK2: reversible conversion of a hippocampal potassium leak into a voltage-dependent channel.

Nat Neurosci.;4(5):486-91

Borlak J, Thum T (2003):

Hallmarks of ion channel gene expression in end-stage heart failure.

FASEB J.;17(12):1592-608

Brinster R (1974):

The effect of cells transferred into mouse blastocyst on subsequent development.
Exp Med.;140(4):1049-56.

Buckler KJ, Williams BA, Honoré E (2000):

An oxygen-, acid- and anaesthetic-sensitive TASK-like background potassium channel in rat arterial chemoreceptor.
J Physiol.;525 Pt 1:135-42

Buckler KJ (2010):

Two-pore domain k(+) channels and their role in chemoreception
Adv Exp Med Biol; 661:15-30

Burdon-Sanderson J, Page FJM (1882):

On the time-relations of the excitatory process in the ventricle of the heart of the frog
J Physiol 2:385-412

Campbell NA, Markl J (2000):

Biologie
Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, 2. korrigierter Nachdruck (Hrsg.)

Clemo HF, Baumgarten CM (1997):

Swelling-activated Gd³⁺-sensitive cation current and cell volume regulation in rabbit ventricular myocytes.
J Gen Physiol.;110(3):297-312.

Coetzee WA, Amarillo Y, Chiu J, Chow A, Lau D, McCormack T, Moreno H, Nadal MS, Ozaita A, Pountney D, Saganich M, Vega-Saenz de Miera E, Rudy B (1999):

Molecular diversity of K⁺ Channels.
Ann NY Acad Sci 868: 233-285

crb (cambridge research biochemicals) newsletter May 10: Target Antibodys (2010):

www.crbdiscovery.com

Czirják G, Fischer T, Spät A, Lesage F, Enyedi P (2000):

TASK (TWIK-related acid-sensitive K⁺ channel) is expressed in glomerulosa cells of rat adrenal cortex and inhibited by angiotensin II.
Mol Endocrinol 14(6): 863-874

Czirják G, Petheo GL, Spät A, Enyedi P (2001):

Inhibition of TASK-1 potassium channel by phospholipase C.

Am J Physiol Cell Physiol.;281(2):C700-8

Czirják G, Enyedi P (2002):

Formation and functional heterodimers between the TASK-1 and TASK-3 two pore domain potassium channel subunits.

J Biol Chem.;277(7):5426-32.

Davies LA, Hu C, Guagliardo NA, Sen N, Chen X, Talley EM, Carey RM, Bayliss DA, Barrett PQ (2008):

TASK channel deletion in mice causes primary hyperaldosteronism

Proc Natl Acad Sci USA 105(6):2203-8

Duprat F, Lesage F, Fink M, Reyes R, Heurteaux C, Lazdunski M (1997):

TASK, a human background K⁺ channel to sense external pH variations near physiological pH.

EMBO J. ;16(17):5464-71

Fabritz L, Kirchhof P, Franz MR, Nuyens D, Rossenbacker T, Ottenhof A, Haverkamp W, Breithardt G, Carmeliet E, Carmeliet P (2003):

Effect of pacing and mexiletine on dispersion of repolarisation and arrhythmias in Delta K_{VPQ} SCNA5A (long QT3) mice

Cardiovascul Res, 57(4), 1085-93

Fabritz L, Kirchhof P, Franz MR, Eckardt L, Mönnig G, Milberg P, Breithardt G, Haverkamp W (2003):

Prolonged action potential durations, increased dispersion of repolarization, and polymorphic ventricular tachycardia in a mouse model of proarrhythmia.

Basic Res Cardiol.;98(1):25-32

Fabritz L, Kirchhof P, Fortmüller L, Auchampach J, Baba H, Breithardt G, Neumann J, Boknik P, Schmitz W (2004):

Gene dose-dependent atrial arrhythmias, heart block and atrial brady-cardiomyopathy in mice overexpressing the A₃-adenosine receptor.

Cardiovasc Res 62(3): 500-8

Franz MR (1999):

Current status of monophasic action potential recording: theories, measurements and interpretation I

Cardiovasc Res, 41(1),25-40

Franz MR (1994):

Bridging the gap between basic and clinical electrophysiology: what can be learned from monophasic action potential recordings?

J Cardiovasc Electrophysiol.; 5(8):699-710. Review

Gardener MJ, Johnson IT, Burnham MP, Edwards G, Heagerty AM, Weston AH (2004):

Functional evidence of a role for two-pore domain potassium channels in rat mesenteric and pulmonary arteries.

Br J Pharmacol 142(1): 192-202

Gassmann M, Hennet T, Bauer C (1998):

Transgene Mäuse in der Grundlagenforschung.

Schweiz Arch. Tierheilk., 140(5), 198-204

Gehrmann J, Hammer PE, Maguire CT, Wakimoto H, Friedman JK, Berul CI (2000)

Phenotypic screening for heart rate variability in the mouse.

Am J Physiol Heart Circ Physiol; 279(2): H733-40

Graham V, Zhang H, Willis S, Creazzo TL (2006):

Expression of a two-pore domain K⁺ channel (TASK-1) in developing avian and mouse ventricular conduction system.

Dev Dyn, 235(1): 143-51

Gu Z, Steinmetz LM, Gu X, Scharfe C, Davis RW, Li WH (2003):

Role of duplicate genes in genetic robustness against null mutations.

Nature 421(6981): 63-6

Gurney AM, Osipenko ON, MacMillan D, McFarlane KM, Tate RJ, Kempson FE (2003):

Two-pore domain K channel, TASK-1, in pulmonary artery smooth muscle cells.

Circ Res. ;93(10):957-64

Gutman GA, Chandy KG, Adelman JP, Aiyar J, Bayliss DA, Clapham DE, Covarrubias M, Desir GV, Furuichi K, Ganetzky B, Garcia ML, Grissmer S, Jan LY, Karschin A, Kim D, Kuperschmidt S, Kurachi Y, Lazdunski M, Lesage F, Lester HA, McKinnon D, Nichols CG, O'Kelly I, Robbins J, Robertson GA, Rudy B, Sanguinetti M, Seino S, Stuehmer W, Tamkun MM, Vandenberg CA, Wei A, Wulff H und Wymore RS (2003):

International Union of Pharmacology. XLI. Compendium of voltage-gated ion channels: potassium channels.

Pharmacol Rev 55(4):583-6

Harrison DA, Harris L, Siu SC, MacLoughlin CJ, Connelly MS, Webb, Downar E, McLaughlin PR, Williams WG (1997):

Sustained ventricular tachycardia in adult patients late after repair of tetralogy of Fallot.

J Am Coll Cardiol 30(5): 1368-1373

Heitzmann D, Derand R, Jungbauer S, Bandulik S, Sterner C, Schweda F, El Wakil A, Lalli E, Guy N, Mengual R, Reichold M, Tegtmeier I, Bendahhou S, Gomez-Sanchez CE, Aller MI, Wisden W, Weber A, Lesage F, Warth R, Barhanin J (2008):

Invalidation of TASK1 potassium channels disrupts adrenal gland zonation and mineralocorticoid homeostasis.

EMBO J 27(1): 179-87

Jochim, K , Katz LN, Mayne W (1935):

The monophasic electrogram obtained from the mammalian heart

Am J Physiol, 111: 177-186

Jones A, Korpi ER, McKernan RM, Pelz R, Nusser Z, Makela R, Mellor JR, Pollard S, Bahn S, Stephenson RA, Randall AD, Sieghart W, Somogyi P, Smith AJ, Wisden W (1997):

Ligand-gated ion channel subunit partner-ships: GABAA receptor $\alpha 6$ subunit gene inactivation inhibits delta subunit expression.

J Neurosci, 17(4): 1350-62

Jones SA, Morton MJ, Hunter M, Boyett MR (2002):

Expression of TASK-1, a pH sensitive twin-pore domain K^+ channel, in rat myocytes.

Am J Physiol Heart Circ Physiol; 283(1): H181-5

Kannankeril P, Roden DM, Darbar D (2010)

Drug-Induced Long QT Syndrome
Pharmacol Rev 62: 760-781. Review

Kim D, Fujita A, Horio Y, Kurachi Y (1998):

Cloning and functional expression of a novel cardiac two-pore background K⁺ channel(cTBAK-1).
Circ Res 82(4): 513-8

Kim D, Gnatenco C (2001):

TASK-5, a New Member of the Tandem-Pore K⁺ Channel Family.
Biochem Biophys Res Commun 284(4): 923-30

Kim Y, Bang H, Kim D (1999):

TBAK-1 and TASK-1, two pore K⁺ channel subunits: kinetic properties and expression in rat heart.
Am J Physiol 277(5 Pt2): H1669-78

Kirchhof P, Fabritz L, Fortmüller L, Matherne GP, Lankford A, Baba HA, Schmitz W, Breithardt G, Neumann J, Boknik P (2003):

Altered sinus nodal function and atrioventricular nodal function in freely moving mice overexpressing the A1 adenosine receptor
Am J Physiol Heart Circ Physiol; 285(1):H145-153

Knollmann BC, Katchman AN, Franz MR (2001):

Monophasic action potential recordings from intact mouse heart: validation, regional heterogeneity, and relation to refractoriness.
J Cardiovasc Electrophysiol; 12(11): 1286-94

Knollmann BC, Casimiro MC, Katchman AN, Sirenko SG, Schober T, Rong Q, Pfeifer K, Ebert SN (2004)

Isoproterenol exacerbates a long QT phenotype in Kcnq1-deficient neonatal mice: possible roles for human-like Kcnq1 isoform 1 and slow delayed rectifier current
J Pharmacol Exp Ther.; 310(1):311-8

Ko SH, Lee SK, Han YJ, Choe H, Kwak YG, Chae SW, Cho KP, Song HS (1997):

Blockade of the myocardial ATP-sensitive potassium channels by ketamine.
Anesthesiology 87(1):68-74

Leonoudakis D, Gray AT, Winegar BD, Kindler CH, Harada M, Taylor DM, Chavez RA, Forsayeth JR, Yost CS (1998):

An open rectifier potassium channel with two pore domains in tandem cloned from rat cerebellum.

J Neurosci 18(3): 868-77

Lesage F, Guillemare E, Fink M, Duprat F, Lazdunski M, Romey G, Barhanin J (1996):

TWIK-1, a ubiquitous human weakly inward rectifying K⁺ channel with a novel structure.

EMBO J. ;15(5):1004-11.

Lesage F, Lazdunski M (2000):

Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels.

Am J Physiol Renal Physiol.; 279(5):F793-801. Review)

Lopes CM, Zilberberg N, Goldstein SA (2001):

Block of Knck3 by Protons. Evidence that 2P-domain potassium channel subunit function as homodimers

J Biol Chem.;276(27):24449-52

Maingret F, Patel AJ, Lazdunski M, Honoré E (2001):

The endocannabinoid anandamide is a direct and selective blocker of background channel TASK-1

EMBO J.; 20(1-2):47-54

Manning WJ, Wei JY, Katz SE, Litwin SE, Douglas PS (1994):

In vivo assessment of LV mass in mice using high-frequency cardiac ultrasound: necropsy validation

Am J Physiology 266 (4 Pt 2):H1672-5

Marban E (2002):

Cardiac channelopathies.

Nature 415(6868): 213-8

Maron BJ, Towbin JA, Thiene G, Antzelevitch C, Corrado D, Arnett D, Moss AJ, Seidman CE, Young JB (2006):

Contemporary Definitions and Classification of the Cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention.

Circulation 113(14): 1807-16

Martinek RM (2004):

Witnessed asystole during spinal anesthesia treated with atropine and ondansetron: a case report

Can J Anaesth 51(3):226-30

Meuth SG, Kleinschnitz C, Broicher T, Austinat M, Braeuninger S, Bittner S, Fischer S, Bayliss DA, Budde T, Stoll G, Wiendl H (2009):

The neuroprotective impact of the leak potassium channel TASK1 on stroke development in mice.

Neurobiol Dis 33(1):1–11

Meyborg M, Mura R, Tiefenbacher C, Becker R, Michaelsen J, Niroomand F (2003):

Comparative follow up of patients with implanted cardioverter-defibrillators after induction of sustained monomorphic ventricular tachycardias or ventricular fibrillation by programmed stimulation.

Heart 89(6): 629-32

Millar JA, Barratt L, Southan AP, Page KM, Fyffe REW, Robertson B, Mathie A (2000):

A functional role for the two-pore domain potassium channel TASK-1 in cerebellar granule neurons.

Proc Natl Acad Sci USA 97(7): 3614-8

Mitchell GF, Jeron A, Koren G (1998):

Measurement of heart rate and QT interval in the conscious mouse.

Am J Physiol 274(3 Pt 2): H747-51

Mohler PJ, Schott JJ, Gramolini AO, Dilly KW, Guatimosim S, duBell WH, Song LS, Haurogne K, Kyndt F, Ali ME, Rogers TB, Lederer WJ, Escande D, LeMarec H, Bennett V (2003):

Ankyrin-B mutation causes type 4 long QT cardiac arrhythmia and sudden cardiac death.

Nature 421(6923): 634-639

Napolitano C, Priori SG (2006)

Brugada Syndrome

Orphanet J Rare Dis 1:35. Review

Näbauer M, Kääb S (1998):

Potassium channel down-regulation in heart failure.

Cardiovasc Res 37(2): 324-34

Nerbonne JM, Nichols CG, Schwarz TL, Escande D (2001):

Genetic manipulation of cardiac K⁺ channel function in mice.

Circ Res.; 89(11):944-56. Review

Nickel R, Schummer A, Seiferle E (1992):

Lehrbuch der Anatomie der Haustiere: Band 1 Bewegungsapparat

Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg, 6. Auflage

Niwa N, Wang W, Sha Q, Marionneau C; Nerbonne JM (2008):

Kv4.3 is not required for the generation of functional Ito,f channels in adult mouse ventricles.

J Mol Cell Cardiol; 44(1): 65-104

Palmiter RD, Brinster RL, Hammer RE, Trumbauer ME, Rosenfeld MG, Birnberg NC, Evans RM (1982):

Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes.

Nature. ; 300(5893):611-5

Papadatos GA, Wallerstein PMR, Head CEG, Ratcliff R, Brady PA, Benndorf K, Saumarez RC, Trezise AEO, Huang CLH, Vandenberg JI, Colledge WH, Grace AA (2002):

Slowed conduction and ventricular tachycardia after targeted disruption on the cardiac sodium channel gene Scn5a.

Proc Natl Acad Sci USA 99(9): 6210-5

Patel AJ, Honoré E, Lesage F, Fink M, Romey G, Lazdunski M (1999):

Inhalational anesthetics activate two-pore-domain background K⁺ channels.

Nature Neuroscience 2(5): 422-6

Patel C, Antzelevitch (2008)

Pharmacological approach to the treatment of long and short QT syndromes

Pharmacol Ther; 118 (1): 138-151

Priori SG, Schwartz PJ, Napolitano C, Bloise R, Ronchetti E, Grillo M, Vicentini A, Spazzolini C, Nastoli J, Bottelli G, Folli R, Cappelletti D (2003):

Risk stratification in the long-QT syndrome.

N Engl J Med.; 348(19):1866-74

Putzke C, Wemhoner K, Sachse FB, Rinne S, Schlichthorl G, Li XT, Jae L, Eckhardt I, Wischmeyer E, Wulf H, Preisig-Muller R, Daut J, Decher N (2007):

The acid-sensitive potassium channel TASK-1 in rat cardiac muscle.

Cardiovasc Res 75(1): 59-68

Sabbadini M, Yost CS (2009):

Molecular biology of background K channels: insights from K(2P) Knockout mice.

J Mol Biol; 385(5):1331-44. Review.

Schenkel J (2006):

Transgene Tiere.

Springer Verlag: 2. überarbeitete und aktualisierte Auflage

Schrader J (2003):

Bildgebung des Herzens und der Gefäße: Die Maus als Modellsystem.

Jahrbuch der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Sia S, Sarro F, Lepri A, Bartoli M (2003):

The effect of exogenous epinephrine on the incidence of hypotensive/bradycardic events during shoulder surgery in the sitting position during interscalene block

Anesth Analg.; 97(2):583-8

Sirois JE, Lei Q, Talley EM, Lynch C, Bayliss DA (2000):

The TASK-1 two-pore domain K⁺ channel is a molecular substrate for neuronal effects on inhalational anaesthetics

J Neurosci 20(17):6347-54

Smits JP, Eckardt L, Probst V, Bezzina CR, Schott JJ, Remme CA, Haverkamp W, Breithardt G, Escande D, Schulze-Bahr E, LeMarec H, Wilde AA (2002):

Genotype-phenotype relationship in Brugada syndrome: electrocardiographic features differentiate SCN5A-related patients from non-SCN5A-related patients.

J Am Coll Cardiol; 40(2): 350-6

Swynghedauw B, Baillard C; Milliez P (2003):

The long QT interval is not only inherited but is also linked to cardiac hypertrophy.

J Mol Med (Berl); 81(6): 336-45 (2003)

Takagi T, Nishio H, Yagi T, Kuwahara M, Tsubone H, Tanigawa N, Suzuki K (2007):

Phenotypic analysis of vertigo 2 Jackson mice with a Kcnq1 potassium channel mutation.

Exp Anim; 56(4): 295-300

Talley EM, Lei Q, Sirois JE, Bayliss DA (2000):

TASK-1, a two-pore domain K⁺ channel, is modulated by multiple neurotransmitters in motoneurons.

Neuron 25(2): 399-410 (2000)

Talley EM, Bayliss DA (2002):

Modulation of TASK-1 (Kcnk3) and TASK-3 (Kcnk9) potassium channels: volatile anesthetics and neurotransmitters share a molecular site of action.

J Biol Chem; 277(20): 17733-17742

Tamargo J, Caballero R, Gomez R, Valenzuela C, Delpon E (2004):

Pharmacology of cardiac potassium channels.

Cardiovasc Res 62(1): 9-33. Review

Tanaka N, Dalton N, Mao L, Rockman HA, Peterson, KL, Gottschall KR, Hunter JJ, Chien KR, Ross J Jr (1996):

Transthoracic echocardiography in models of cardiac disease in the mouse

Circulation 94(5):1109-1117

Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology (1996):

Heart rate variability. Standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use.

Eur Heart J 17(3):354-81

Thireau J, Zhang BL, Poisson D, Barbuty D (2007)

Heart rate variability in mice: a theoretical and practical guide

Exp Physiol; 93(1):83-94

Thomas D, Kiehn J, Katus HA, Karle CA (2004):

Adrenergic regulation of the rapid component of the cardiac delayed rectifier potassium current, I(Kr), and the underlying hERG ion channel.

Basic Res Cardiol; 99(4): 279-87

Tiemann K, Weyer D, Djoufack PC, Ghanem A, Lewalter T, Dreiner U, Meyer R, Grohe C, Fink KB (2003):

Increasing myocardial contraction and blood pressure in C57Bl/6 mice during early postnatal development

Am J Physiol Heart Circ Physiol 284(2):H464-74

Tomaselli GF, Beuckelmann DJ, Calkins HG; Berger RD, Kessler PD, Lawrence JH, Kass D, Feldmann AM, Marban E (1994)

Sudden cardiac death in heart failure. The role of abnormal repolarization.

Circulation; 90(5): 2534-9

Tomaselli GF, Marban E (1999):

Electrophysiological remodeling in hypertrophy and heart failure.

Cardiovasc Res 42(2): 270-83

Trapp S, Aller MI, Wisden W; Gourine AV (2008):

TASK-1 (KNCK3) channels in the chemosensory control of breathing

J Neurosci 28(35):8844-50

Veitia RA (2002):

Exploring the etiology of haploinsufficiency.

Bioessays; 24(2): 175-84

Volders PG, Vos MA, Szabo B, Sipido KR, de Groot SH, Gorgels AP, Wellens HJ and Lazzara R (2000):

Progress in the understanding of cardiac early afterdepolarizations and torsades de pointes: time to revise current concepts.

Cardiovas Res 46(3): 376-92

Walinski H (2004):

Studying gene function: creating knockout mice.

<http://www.scq.ubc.ca/?p=264>, Stand: 13.01.08

Wang Z, Tristani-Firouzi M, Xu Q, Lin M, Keating MT, Sanguinetti MC (1999):

Functional effects of mutations in KvLQT1 that cause long QT syndrome.

J Cardiovasc Elektrophysiol; 10(6):817-26

Wehrens XHT, Lehnart SE, Huang F, Vest JA, Reiken SR, Mohler PJ, Sun J, Guatimosim S, Song LS, Rosemlit N, D'Armiento JM, Napolitano C, Memmi M, Prior SG, Lederer WJ, Marks AR (2003):

FKBP12.6 deficiency and defective calcium release channel (ryanodine receptor) function linked to exercise-induced sudden cardiac death.

Cell 113(7): 829-40

Wehrens XH, Lehnart SE, Reiken SR, Deng S-X, Vest JA, Cervantes D, Coromilas J, Landry DW, Marks AR (2004):

Protection from cardiac arrhythmia through ryanodine receptor-stabilizing protein calstabin2.

Science; 304(5668): 292-6

Wickenden AD, Lee P, Sah R, Huang Q, Fishman GI, Backx PH (1999)

Targeted expression of a dominant-negative K(v)4.2(+) channel subunit in the mouse heart.

Circ. Res.; 85(11)1067-76

Wiesmann F, Ruff J, Engelhardt S, Hein L, Dienesch C, Leupold A, Illinger R, Frydrychowicz A, Hiller KH, Rommel E, Haase A, Lohse MJ, Neubauer S (2001):

Dobutamine-stress magnetic resonance microimaging in mice: acute changes of cardiac geometry and function in normal and failing murine hearts

Circ Res; 88(6): 563-9

Wolpert L (Hrsg.), Beddington R, Brockes J, Jessel T, Lawrence P, Meyrowitz E (1999):

Entwicklungsbiologie

Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin

Xu M, Welling A, Paparisto S, Hofmann F, Klugbauer N (2003):

Enhanced expression of L-type Cav1.3 calcium channels in murine embryonic hearts from Cav1.2-deficient mice.

J Biol Chem; 278(42): 40837-41

Yamada S, Kane GC, Behfar A, Liu XK, Dyer RB, Faustino RS, Miki T, Senio S, Terzic A (2006):

Protection conferred by myocardial ATP-sensitive K⁺ channels in pressure overload-induced congestive heart failure revealed in KCNJ11 Kir6.2-null mutant.

J Physiol; 577 (Pt 3):1053-65.

Yin FC, Spurgeon HA, Rakusan K, Weisfeldt ML, Lakatta EG (1982):

Use of tibial length to quantify cardiac hypertrophy: application in the aging rat.

Am J Physiol 243(6): H941-7

Zaritsky JJ, Redell JB, Tempel BL, Schwarz TL (2001)

The consequences of disrupting cardiac inwardly rectifying K⁺ current (I_{K1}) as revealed by the targeted deletion of the murine Kir2.1 and Kir2.2 genes.

J Physiol; 533(Pt 3): 697-710

Zhou J, Kodirov S, Murata M, Buckett PD, Nerbonne JM, Koren G (2003):

Regional upregulation of Kv2.1-encoded current, I_{K,slow2}, in Kv1DN mice is abolished by crossbreeding with Kv2DN mice.

Am J Physiol Heart Circ Physiol; 284(2): H491-H500

Zwafink, C (2007):

Diplomarbeit: „Kardiale Phänotypisierung der TASK-1 „Knock-out“ Maus“.

Fachbereich Biologie an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

9. Erklärung

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Datum: _____

Unterschrift: _____

10. Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Petric S, Clasen L, van Wessel C, Geduldig N, Ding Z, Schullenberg M, Mersmann J, Zacharowski K, Aller MI, Schidt KG, Donner BC

In vivo electrophysical characterization of TASK-1 deficient mice.

Cell Physiol Biochem 2012; 30(3): 523-37

Donner BC, Schullenberg M, Geduldig N, Hüning A, Mersmann J, Zacharowski K, Kovacevic, Decking U, Aller IM, Schmidt KG

Functional role of TASK-1 in the heart: studies in TASK-1 deficient mice show prolonged cardiac repolarization and reduced heart rate variability.

Basic Res Cardiol 2011; 106(1): 75-87

11. Danksagung

Eine Vielzahl von Menschen haben mich aktiv wie passiv bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt und dafür möchte ich an dieser Stelle Dank sagen.

Allen voran meinen Betreuern Prof. Dr. Birgit Donner und Herrn Prof. Dr. Ernst Petzinger, die diese Arbeit überhaupt erst ermöglicht und mich jederzeit unterstützt und motiviert haben.

Außerdem meinen „Mit-Doktoranden“ und „Mit-Diplomanden“, Anja Hüning, Christine Zwafink und Nora-Marie Geduldig mit denen ich Labor und Equipment sowie Hochs und Tiefs teilen konnte.

Allen, die mich in Ihren Instituten und Geräten willkommen heißen und Zeit darauf verwendet haben mir den richtigen Umgang zu zeigen: Dr. Isabell Aller, Prof. Dr. Ulrich Decking, Dr. Zhaoping Ding, Dr. Jan Mersmann, Dr. Sager und Frau Schrey und die gesamte TVA. Vielen Dank auch an Nina Kreienkamp an der Universität Münster für lange Telefonate und große Auskunftsfreude.

Dazu allen TAs die mir den einen oder anderen Kniff gezeigt und immer wieder Chemikalien etc. ausgeliehen haben: Elke, Annette, Martina.

Natürlich auch jenen Firmen, die mit konstruktiven Ideen (Sven Haupt; ADInstruments) oder neu entwickelten Geräten (Hugo Sachs/ Harvard Apparatus; Hr. Beha) einiges erleichtert und neue Wege aufgezeigt haben.

Mein größter Dank gilt aber denen die den Grundstein gelegt haben, meinen Eltern und natürlich dem Menschen der mich immer bedingungslos unterstützt hat: Danke Marion!



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6072-5

